

Aus der Medizinischen Poliklinik – Innenstadt,
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke
Rheuma-Einheit
Leiter: Prof. Dr. med. Hendrik Schulze-Koops

**Die Bedeutung von Methylentetrahydrofolat-Reduktase
C677T- und A1298C-Genpolymorphismen für die Wirksamkeit und Verträglichkeit
einer Methotrexattherapie bei Kindern mit juveniler idiopathischer Arthritis**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gayane Poghosyan
aus Jerewan, Armenien

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Hendrik Schulze-Koops
Mitberichterstatter:	PD Dr. med. Susanne Bechtold-Dalla Pozza Prof. Dr. med. Bernhard Heimkes
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. Rudolf Gruber Dr. med. Hartmut Michels Dr. med. Herbert Plischke
Dekan:	Prof. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	22.01.2009

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Rheumaeinheit des Universitätsklinikums der LMU München und unter der Leitung von Prof. Dr. med. Hendrik Schulze-Koops angefertigt. Bei ihm möchte ich mich sehr herzlich bedanken für die freundliche Aufnahme meiner Arbeit sowie für die ausgezeichnete Betreuung und für seine fachlich immer höchstkompetente, aber auch unendlich geduldige Beratung bei der Erstellung meiner Dissertation.

Herrn Dr. Hartmut Michels, dem Ärztlichen Direktor des Deutschen Zentrums für Kinder- und Jugendrheumatologie (DZKJR) in Garmisch-Partenkirchen, danke ich ganz herzlich für die Möglichkeit, diese Studie im DZKJR durchzuführen, sowie für sein ständiges Interesse am Fortgang der Arbeit, seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und großzügige vielseitige Unterstützung.

Herrn Dr. Herbert Plischke danke ich für das Thema meiner Arbeit, für die wertvolle Hilfe bei deren Planung und Durchführung sowie für die Bereitstellung der SPSS-Lizenz und die Beratung bei der statistischen Auswertung.

Bei Herrn PD Dr. Rudolf Gruber bedanke ich mich für die Ermöglichung der Genotypanalyse in seinem Labor sowie für die freundliche Beratung bei der Befundbewertung. Ebenso bin ich allen Mitarbeiterinnen des Labors sehr dankbar.

Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Kuon danke ich für viele motivierende Gespräche, für die zügige Unterstützung und hilfreichen Ratschläge während der Durchführung meiner Arbeit. Nicht zuletzt dank seiner Hilfe haben sich viele Dinge leichter als erwartet erledigen lassen.

Meinen besonderen Dank möchte ich allen Patienten des DZKJR und ihren Eltern aussprechen für die freundliche Teilnahme an dieser Studie, sowie den ärztlichen und Pflege-Mitarbeitern des DZKJR für ihre kollegiale Mithilfe. Herzlichen Dank gilt auch an Frau G. Grohmann für ihre Hilfe bei der Patientenrekrutierung, an Frau G. Brasch für die ständige Hilfsbereitschaft bei allen großen und kleinen organisatorischen Problemen, sowie an Frau C. Jocher für die Unterstützung bei EDV-Problemen.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei der Hanns-Seidel Stiftung, dem Verein „Hilfe für das rheumakranke Kind e.V.“ sowie bei der Europäischen Rheumaliga (EULAR) für die finanzielle Förderung, ohne die es nicht möglich gewesen wäre, diese Arbeit in Deutschland zu absolvieren.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Freunden in Garmisch-Partenkirchen, vor allem Heinrich und Paulina Gerlinski sowie Bernadett Fischer für ihre enorme „alltägliche“ Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Arbeit. Ganz herzlich danke ich auch allen Freunden in Jerewan, insbesondere Varsine, Mariam, Tatevik, Astghik, Tigran, Knarik und Rima, die trotz der weiten Entfernung mich immer unterstützt und motiviert haben. Ebenso möchte ich Anton Verbine für seine Hilfe bei der Antragschreibung sowie für die Zusendung zahlreicher Biostatistik-Literatur danken.

Vor allem aber bedanke ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester, dass sie mir immer unterstützend zur Seite gestanden haben und mir damit vieles im Leben ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	7
1.1.	Juvenile idiopathische Arthritis (JIA)	7
1.1.1.	Definition und Klassifikation der JIA.....	7
1.1.2.	Epidemiologie der JIA	9
1.1.3.	Medikamentöse Therapie der JIA	9
1.1.4.	Einschätzung der Erkrankungssituation und Messung des Therapieerfolges.....	12
1.1.5.	Outcome der JIA	14
1.2.	Molekularer Wirkmechanismus von Methotrexat.....	14
1.3.	Pharmakogenetik und Pharmakogenomik	16
1.4.	Pharmakogenetik und Pharmakogenomik von Methotrexat	17
1.5.	Methylentetrahydrofolat-Reduktase	19
1.5.1.	MTHFR-Genpolymorphismus	19
1.5.1.1.	Einzelnukleotid-Polymorphismus C677T.....	19
1.5.1.2.	Einzelnukleotid-Polymorphismus A1298C	21
1.5.1.3.	C677T - A1298C kombinierte Varianten.....	21
1.6.	Wechselwirkung zwischen MTX und MTHFR	22
1.6.1.	MTHFR-Genpolymorphismen und niedrig-dosierte MTX-Therapie: Stand der Forschung.....	22
1.7.	Problemstellung und Zielsetzung	25
2.	Patienten, Materialien und Methoden	26
2.1.	Patienten	26
2.2.	Studiendesign und Ablauf	26
2.3.	Datenerhebung	26
2.4.	Probenentnahme und DNA-Isolierung.....	28
2.5.	Nachweis der MTHFR C677CT- und A1298C-Polymorphismen.....	28
2.5.1.	Selektive Amplifikation der DNA-Fragmente mittels PCR.....	29
2.5.2.	Restriktionsverdau des PCR-Produktes mittels allelspezifischer Restriktionsenzyme.....	30
2.5.3.	Auftrennung der DNA-Fragmente mittels 3%-Agarosegelelektrophorese	31
2.6.	Datenschutz.....	32
2.7.	Statistische Datenanalyse.....	32
3.	Ergebnisse	34
3.1.	Eigenschaften und Verteilung des Patientenkollektivs	34
3.1.1.	MTHFR-Genpolymorphismus C677T und A1298C.....	36
3.2.	Bewertung der Wirksamkeit der MTX-Therapie	39
3.2.1.	Krankheitsaktivität bei MTX-Therapiebeginn.....	39
3.2.2.	Ansprechen auf MTX nach 6 Therapiemonaten.....	39

3.2.2.1. MTHFR C677T-Polymorphismus und Ansprechen auf MTX nach 6 Monaten	42
3.2.2.2. MTHFR A1298C-Polymorphismus und Ansprechen auf MTX nach 6 Monaten	42
3.2.2.3. Ansprechen auf MTX nach 6 Therapiemonaten: Regressionsanalyse der Einflussvariablen.....	43
3.2.3. Ansprechen auf MTX nach 12 Therapiemonaten	43
3.2.3.1. MTHFR C677T-Polymorphismus und Ansprechen auf MTX nach 12 Monaten	46
3.2.3.2. MTHFR A1298C-Polymorphismus und Ansprechen auf MTX nach 12 Monaten	46
3.2.3.3. Ansprechen auf MTX nach 12 Therapiemonaten: Regressionsanalyse der Einflussvariablen.....	47
3.3. Bewertung der Verträglichkeit der MTX-Therapie.....	48
3.3.1. MTHFR C677T-Polymorphismus und MTX-assoziierte Toxizität	52
3.3.2. MTHFR A1298C-Polymorphismus und MTX-assoziierte Toxizität.....	56
3.3.3. MTX-Verträglichkeit: Regressionsanalyse der Einflussvariablen	60
4. Diskussion.....	63
4.1. Bewertung der Ergebnisse: MTX-Verträglichkeit.....	63
4.2. Bewertung der Ergebnisse: MTX-Wirksamkeit	67
5. Zusammenfassung.....	69
6. Literaturverzeichnis.....	71
7. Tabellenverzeichnis	83
8. Abbildungsverzeichnis.....	84
9. Abkürzungsverzeichnis.....	85
10. Lebenslauf	87

1. Einleitung

1.1. Juvenile idiopathische Arthritis (JIA)

1.1.1. Definition und Klassifikation der JIA

Die „International League of Associations for Rheumatology“ (ILAR) führte 1993 den Begriff „*juvenile idiopathische Arthritis*“ als Sammelbezeichnung für die Gruppe der chronischen Arthritiden im Kindesalter ein (Fink CW, 1995). Juvenile idiopathische Arthritis (JIA) ist definiert als Arthritis (Schwellung und/oder Bewegungseinschränkung mit Bewegungsschmerz/Palpationsempfindlichkeit eines oder mehrerer Gelenke) mit Krankheitsbeginn vor dem 16. Lebensjahr, einer Dauer der Arthritis von mindestens 6 Wochen, wenn andere, mit ähnlicher Symptomatik einhergehende Erkrankungen ausgeschlossen sind (Petty RE, 2004).

Nach der aktuellen ILAR-Klassifikation (zweite Revision, Edmonton 2001) werden sieben Kategorien der JIA unterschieden: Oligoarthritis (persistierende oder erweiterte), Rheumafaktor(RF)-positive Polyarthritiden, RF-negative Polyarthritiden, systemische Arthritis, Psoriasisarthritis, Enthesitis-assoziierte Arthritis und undifferenzierte Arthritis (Petty RE, 2004). Die Kategorienzuzuordnung der JIA erfolgt aufgrund der klinischen Symptomatik während der ersten 6 Erkrankungsmonate. Für jede Kategorie müssen die Haupt- bzw. Haupt- und Nebenkriterien der JIA erfüllt sein, gleichzeitig müssen die Kategorie-spezifischen Ausschlusskriterien berücksichtigt werden (Tabelle 1). Die Kategorien der JIA schließen sich gegenseitig aus.

Zusätzlich können definierte „**Deskriptoren**“ zur Beschreibung der Erkrankung verwendet werden, die zusätzliche Information über die Erkrankung liefern, bei der Klassifikation aber nicht berücksichtigt werden (Petty RE, 2004). Diese sind: Manifestationsalter, Gelenkbefallsmuster (große/kleine Gelenke, symmetrisch/asymmetrisch, überwiegend Gelenke der unteren oder oberen Extremitäten sind befallen, individueller Gelenkbefall), Verlauf (gesamte Zahl der betroffenen Gelenke), Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA), akute vs. chronische anteriore Uveitis, Assoziation mit bestimmten HLA-Allelen.

Tabelle 1: ILAR-Klassifikationskriterien (Edmonton 2001) der JIA

Definition der juvenilen idiopathischen Arthritis (JIA):

- Arthritis, definiert als eine vom Arzt diagnostizierte und nicht unmittelbar mit einer mechanischen oder anderer erkennbarer Ursache verbundene
 - Schwellung eines Gelenkesoder
 - Bewegungseinschränkung und Bewegungsschmerz/Palpationsempfindlichkeit im Bereich eines Gelenkes
- Manifestation vor dem 16. Geburtstag
- Dauer mindestens 6 Wochen
- Ausschluss anderer Ursachen

Für jede der sieben Kategorien der JIA müssen ein oder mehrere der folgenden **Ausschlusskriterien** a - e berücksichtigt werden:

- a. ärztlich gesicherte Psoriasis beim Patienten selbst oder bei einem Verwandten ersten Grades
- b. Arthritis bei einem HLA-B27-positiven Jungen mit Krankheitsbeginn nach dem 6. Lebensjahr
- c. ankylosierende Spondylitis, Enthesitis-assoziierte Arthritis, Sakroiliitis bei entzündlicher Darmerkrankung, Reiter Syndrom oder akute anteriore Uveitis bei einem Verwandten ersten Grades
- d. Rheumafaktor - Nachweis bei mindestens zwei Untersuchungen im Abstand von mindestens 3 Monaten
- e. Symptome der systemischen JIA

Tabelle 1 cont'd: ILAR-Klassifikationskriterien der JIA

Kategorien der JIA (Definition und Ausschlusskriterien)
Systemische Arthritis Arthritis und Fieber (im zeitlichen Zusammenhang mit der Arthritis auftretend oder dieser vorausgehend, von mindestens zwei Wochen Dauer und an mindestens 3 Tagen intermittierend) und mindestens eines der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> — flüchtiger (nicht-fixierter), erythematöser Hautausschlag — generalisierte Lymphknotenschwellung — Hepato- und/oder Splenomegalie — Serositis Ausschlusskriterien: a, b, c, d
Oligoarthritis* 1-4 Gelenke in den ersten 6 Erkrankungsmonaten betroffen Es werden zwei Subkategorien der Oligoarthritis unterschieden: <ul style="list-style-type: none"> • persistierende Oligoarthritis: im gesamten Verlauf insgesamt nicht mehr als 4 Gelenke betroffen • erweiterte Oligoarthritis: nach den ersten 6 Erkrankungsmonaten kumulativ mehr als 4 Gelenke betroffen Ausschlusskriterien: a, b, c, d, e
Rheumafaktor-negative Polyarthritis* 5 und mehr Gelenke in den ersten 6 Monaten betroffen Untersuchung auf Nachweis von RF ist negativ Ausschlusskriterien: a, b, c, d, e
Rheumafaktor-positive Polyarthritis* 5 und mehr Gelenke in den ersten 6 Monaten betroffen RF in den ersten 6 Erkrankungsmonaten mindestens zweimal im Abstand von 3 Monaten positiv nachgewiesen Ausschlusskriterien: a, b, c, e
Psoriasisarthritis Arthritis und Psoriasis** oder Arthritis und mindestens zwei der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> — Daktylitis (über das Gelenk hinausgehende Schwellung eines oder mehrerer Finger, häufig asymmetrisch) — Nageltüpfelung oder Onycholyse — Psoriasis bei einem Verwandten ersten Grades** Ausschlusskriterien: b, c, d, e
Enthesitis-assozierte Arthritis Arthritis und Enthesitis (Druckschmerz am Knochenansatz von Sehnen, Bändern, Gelenkkapseln oder Faszien) oder Arthritis oder Enthesitis und mindestens zwei der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> — Druckschmerz über den Iliosakralgelenken und/oder entzündlicher Rückenschmerz im Lumbosakralbereich (Ruheschmerz, mit einer Morgensteifigkeit, bessert sich bei Bewegung) — HLA-B27-Nachweis — Manifestation der Arthritis bei einem Jungen im Alter > 6 Jahre — ankylosierende Spondylitis, Enthesitis-assozierte Arthritis, Sakroiliitis bei entzündlicher Darmerkrankung, Reiter-Syndrom oder akute anteriore Uveitis bei einem Verwandten ersten Grades Ausschlusskriterien: a, d, e
Undifferenzierte Arthritis Arthritis, die keiner oder gleichzeitig mehr als einer Kategorie zugeordnet werden kann.
* Jedes Gelenk wird einzeln gezählt. Ausnahme: die kleinen Gelenke der Halswirbelsäule, des Carpus und des Tarsus gelten als ein Gelenk. ** Psoriasis muss vom Arzt bestätigt werden (jedoch nicht unbedingt von einem Dermatologen)

Im nordamerikanischen Raum wird nach wie vor auch der Begriff „*juvenile rheumatoide Arthritis*“ (JRA) verwendet. Die American College of Rheumatology (ACR)-Klassifikationskriterien definieren die JRA als eine Arthritis, die sich vor dem 16. Geburtstag manifestiert und mindestens 6 Wochen dauert (Brewer EJ, 1977). Es werden drei Subtypen der JRA unterschieden, nämlich die oligoartikuläre, die polyartikuläre und die systemische, welche aufgrund der klinischen Befunde während der ersten 6 Erkrankungsmonate definiert werden. Die juvenile ankylosierende Spondylitis, die Arthritis bei entzündlichen Darmerkrankungen sowie die juvenile Psoriasisarthritis sind in der ACR-Klassifikation nicht eingeschlossen. Die JRA ist eine Ausschlussdiagnose, d.h. rheumatische und nicht-rheumatische Erkrankungen mit ähnlicher Symptomatik müssen vorher ausgeschlossen werden. Die ACR-Klassifikationskriterien sind validiert (Cassidy JT, 1986). Obwohl sich beide Klassifikationen im Wesentlichen auf die gleiche Erkrankung beziehen, dürfen sie aufgrund der Definitionsunterschiede jedoch nicht synonym verwendet werden (Minden K, 2007).

1.1.2. Epidemiologie der JIA

Die Daten aus der bislang publizierten Literatur zur Inzidenz und Prävalenz der JIA zeigen erhebliche Unterschiede mit einer Inzidenz zwischen 0,8 und 22,6 bzw. einer Prävalenz zwischen 7 und 401 pro 10⁵ Kinder <16 Jahre (Manners PJ, 2002; Bernston L, 2003). Für Deutschland berichteten zwei Untersuchungen eine Inzidenz zwischen 3,3 und 6,6 pro 10⁵ pro Jahr und eine Prävalenz zwischen 15 und 20 pro 10⁵ Kinder <16 Jahre (Kiessling U, 1998; Von Koskull S, 2001).

In den europäischen Ländern kommt für 50-60% aller JIA-Fälle die Oligoarthritis auf, wobei Mädchen ca. dreimal häufiger als Jungen betroffen sind. Das Manifestationsalter liegt durchschnittlich zwischen dem 2. und 4. Lebensjahr. Die RF-negative Polyarthritis tritt in ca. 25-30% und die RF-positive Polyarthritis in 3-5% aller JIA-Fälle auf. Auch hier sind die Mädchen ca. drei- bis fünfmal häufiger betroffen als Jungen. Das Manifestationsalter zeigt eine bimodale Verteilung mit dem ersten Maximum zwischen dem 1. und 4. und dem zweiten Maximum zwischen dem 6. und 16. Lebensjahr. Auch bei Psoriasisarthritis (ca. 8%) dominiert das weibliche Geschlecht, während bei Enthesitis-assoziiierter Arthritis (ca. 12%) Jungen zwei- bis dreimal häufiger betroffen sind. Die systemische Arthritis macht 10-15% aller JIA Fälle aus, dabei ist die Geschlechtsverteilung ausgeglichen, das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen dem 1. und 5. Lebensjahr (Cassidy JT, 2005; Minden K, 2007).

1.1.3. Medikamentöse Therapie der JIA

Bei der Behandlung einer JIA werden die folgenden Medikamentengruppen eingesetzt:

- Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR)
- Glukokortikoide
- Basistherapeutika (DMARDs, disease modifying antirheumatic drugs)
- Biologika

NSAR

NSAR werden hauptsächlich zur Schmerzlinderung und initialen Entzündungshemmung eingesetzt (Hashkes PJ, 2005). Bei Kindern zugelassen sind Diclofenac, Ibuprofen, Indometazin und Naproxen. Die Monotherapie ist vor allem bei persistierender Oligoarthritis effektiv (Hashkes PJ, 2005). Bei ungenügendem Ansprechen auf NSAR innerhalb der ersten 3 Therapiemonate oder bei polyarthritischen, systemischen und/oder destruktiven Verläufen müssen jedoch möglichst früh zusätzlich Basistherapeutika eingesetzt werden (Hashkes PJ, 2005). Von unerwünschten Wirkungen werden am häufigsten gastrointestinale Symptome beobachtet.

Glukokortikoide

Glukokortikoide können lokal (intraartikuläre Injektionen, Lokalthherapie am Auge bei Uveitis) oder systemisch eingesetzt werden. Intraartikuläre Injektionen werden gut toleriert, sind wirksam, komplikationsarm und führen rasch zur Rückbildung der Synovialitis oft mit langfristiger Remission (Ganser G, 2007). Mittels intraartikulär applizierter Glukokortikoide können bei rechtzeitigem Einsatz Arthritis-Komplikationen wie Kontrakturen oder auch die Entwicklung einer Beinlängendifferenz verhindert werden (Padeh S, 1998; Sherry DD, 1999). Hinsichtlich Remissionshäufigkeit und -dauer erwies sich Triamcinolon-Hexacetonid in zwei Studien wirksamer als Triamcinolon-Acetonid (Zulian F, 2004; Eberhard BA, 2004). Komplikationen sind selten. Am häufigsten treten Lipoatrophien im Bereich der Einstichstelle auf (Hashkes PJ, 2005).

Bei Uveitis werden Glukokortikoidaugentropfen/-salbe lokal am Auge angewendet. Als Nebenwirkungen können bei längerfristiger Lokalbehandlung eine Katarakt oder ein Glaukom auftreten.

Systemisch werden Glukokortikoide wegen der zahlreichen unerwünschten Wirkungen (Wachstumsverminderung, Übergewicht, Osteoporose, Bluthochdruck etc.) nur bei strenger Indikation eingesetzt (Weller F, 2005). Zeitlich begrenzt kann eine systemische Prednisontherapie (oral oder parenteral) als „bridging therapy“ zur raschen Entzündungshemmung bis zum Wirkungseintritt der Basistherapie eingesetzt werden. Absolute Indikationen für eine hochdosierte systemische Gabe entweder als Puls-Therapie oder oral mit 2mg/kg/Tag Prednison stellen die schwere Myokarditis bei systemischer JIA, eine Uveitis mit Makulaödem und das Makrophagenaktivierungssyndrom (MAS) dar (Michels H, 2005).

Basistherapie

Methotrexat

Methotrexat (MTX) ist das bei JIA am häufigsten eingesetzte Basistherapeutikum, wenn es nicht gelingt, unter einer Therapie mit NSAR über einen Zeitraum von mindestens 6-8 Wochen (jedoch nicht länger als 3 Monate) und/oder nach intraartikulärer Steroid-Injektion die Krankheitsaktivität ausreichend zu kontrollieren (Niehues T, 2004). In zwei Placebo-kontrollierten Doppelblindstudien konnte die Wirksamkeit der MTX-Therapie bei Kindern mit JIA nachgewiesen werden (Giannini EH, 1992; Woo P, 2000). Bei unzureichendem Ansprechen nach 3-6 Monaten mit der Standarddosierung von 10mg MTX/m² *Körperoberfläche(KOF)/Woche wird eine Dosiserhöhung auf 15-20 mg/m²*KOF/Woche empfohlen (Niehues T, 2004). In der multizentrischen PRINTO Studie „Intermediate vs. high-dose“ MTX zeigten 62% der Patienten, bei denen die Standarddosierung innerhalb von 9 Monaten keine Effektivität aufwies, ein Ansprechen bei Erhöhung der Dosis auf 15mg/m²*KOF/Woche parenteral. Eine Dosiserhöhung bis auf 30mg/m²*KOF/Woche brachte keine weitere Wirkungsverbesserung (Ruperto N, 2004).

Die Bioverfügbarkeit von MTX unterscheidet sich bei oraler vs. parenteraler Applikation (intramuskulär oder subkutan) bis zu einer Dosis von 10-12mg/m² nicht (Balis FM, 1983; Balis FM, 1988; Hamilton RA, 1997). Bei höheren Dosierungen ist die Bioverfügbarkeit bei parenteraler Applikation jedoch besser (Balis FM, 1983; Balis FM, 1988; Hamilton RA, 1997; Hoekstra M, 2004). Ob das auch zur unterschiedlichen Effektivität einer MTX-Therapie führt, konnte bislang nicht endgültig geklärt werden (Niehues T, 2004). Obwohl in mehreren Studien eine bessere Wirkung der intramuskulären bzw. subkutanen Applikation im Vergleich zu oralen Gabe gezeigt werden konnte (Alsufyani K, 2004; Braun J, 2008; Lambert CM, 2004; Linde L, 2006; Rozin A, 2002; Wegrzyn J, 2004), wurden die individuellen MTX-Serumkonzentrationen hinsichtlich der klinischen Wirksamkeit von MTX bei unterschiedlichen Applikationswegen nicht analysiert. Es muss berücksichtigt werden, dass eine erhebliche interindividuelle Variabilität der MTX-Bioverfügbarkeit, insbesondere bei oraler (aber auch bei subkutaner bzw. intramuskulärer) Applikation besteht (Balis FM, 1983; Godfrey C, 1998; Ravelli A, 1993; Wallace CA, 1989). Eine Untersuchung an 46 RA-Patienten fand keine Korrelation zwischen der Effektivität und der Pharmakokinetik von MTX bei intramuskulärer Applikation (Lafforgue P, 1995).

Es liegen keine einheitlichen Daten bezüglich einer prophylaktischen Supplementierung mit Folsäure begleitend zur MTX-Therapie bei pädiatrischen Patienten mit rheumatischen Erkrankungen vor (Ravelli A, 1999; Hunt PG, 1997). In Studien an RA-Patienten wurde eine signifikante Abnahme der Häufigkeit von MTX-assoziierten Nebenwirkungen bei Folatgabe in einer Dosierung von 1-5mg/Tag beobachtet (Ortiz Z, 1999; Van Ede AE, 2001; Harten P, 2005). Die meisten Untersuchungen zeigten dabei keine klinisch bedeutsame MTX-Wirkungsverminderung bei einer gleichzeitigen Supplementierung mit Folsäure (Harten P, 2005; Killeen OG, 2006; Whittle SL, 2004). Eine *post-hoc* Analyse zweier randomisierter kontrollierter Studien fand jedoch eine Verminderung der Wahrscheinlichkeit des ACR20-, ACR50- und ACR70-Ansprechens bei RA-Patienten nach 52 Wochen der MTX-Behandlung unter Folsäuresupplementierung (Khanna D, 2005). Für Folsäure (Leukovorin) konnte eine Effektivitätsverminderung gezeigt werden, dabei scheint die Wirkungshemmung vom MTX:Folinat

Dosisverhältnis sowie vom Applikationszeitpunkt des Folinat abhängig zu sein (Harten P, 2005; Killeen OG, 2006; Whittle SL, 2004).

Es gibt bislang keine kontrollierten Daten über den optimalen Zeitpunkt zur Beendigung einer MTX-Therapie (Niehues T, 2004). In zwei retrospektiven Untersuchungen wurde MTX bei insgesamt 42 JIA-Patienten nach Erreichen einer Krankheitsinaktivität abgesetzt (Gottlieb BS, 1997; Ravelli A, 1995). Dabei trat bei 18 Kindern eine Krankheitsreaktivierung auf, meist bereits im ersten Jahr nach Absetzen von MTX. Gottlieb et al. (1997) fanden eine höhere Reaktivierungshäufigkeit, wenn das MTX bei einer Remissionsdauer < 12 Monate abgesetzt wurde. Dies konnte jedoch in einer prospektiven Untersuchung an 25 JIA-Patienten nicht bestätigt werden (Foell D, 2004).

An unerwünschten Wirkungen von MTX werden am häufigsten gastrointestinale Symptome wie Übelkeit, Erbrechen und/oder Bauchschmerzen beobachtet (Niehues T, 2004). Im Verlauf der Therapie entwickelt sich nicht selten ein ausgeprägtes Ekelgefühl gegenüber dem MTX, das zu einem frühzeitigen Therapieabbruch zwingt (Weller F, 2005). Häufig wird eine meist vorübergehende Transaminasenerhöhung beobachtet (Ortiz-Alvarez O, 2004). Eine irreversible Leberfibrose unter MTX-Therapie wurde bei Kindern bis jetzt jedoch nicht dokumentiert (Franke J, 1996; Graham LD, 1992; Hashkes PJ, 1997; Hashkes PJ, 1999; Keim D, 1990; Kugathasan S, 1996; Lahdenne P, 2002; Ortiz-Alvarez O, 2004). Leberbiopsien sind daher nur in Ausnahmesituationen (persistierende starke Transaminasenerhöhung, vorbestehende oder neu erworbene Lebererkrankung) indiziert (Niehues T, 2004). Vorübergehende Leukopenien sind häufig, eine darüber hinausgehende MTX-bedingte Hämatotoxizität findet sich jedoch selten (Ortiz-Alvarez O, 2004). Selten wird eine Nodulosis unter MTX beobachtet (Falcini F, 1997; Muzaffer MA, 1996). Unerwünschte pulmonale MTX-Wirkungen (Lungenfibrose) sind gefürchtet, werden im Kindesalter aber nur ausnahmsweise gesehen (Camiciottoli G, 1998; Cron RQ, 1998; Graham LD, 1992; Pelucci A, 1994; Schmeling H, 2002). Schwere Infektionen kommen sehr selten vor (Niehues T, 2004). Generell können Totimpfungen unter einer immunsuppressiven Therapie (einschließlich MTX) verabreicht werden, Impfungen mit Lebendimpfstoffen sind hingegen zu vermeiden (Empfehlungen der Ständigen Impfkommision am Robert-Koch Institut (*Epidemiologisches Bulletin* 39/2005) sowie die von American Academy of Pediatrics (*Red Book* 2006); weitere Information in der Übersichtarbeit von Minden et al. (2007)). Bei mit MTX behandelten JIA-Patienten wurden bislang einzelne Fälle von Hodgkin und non-Hodgkin Lymphom berichtet (Cleary AG, 2002; Krugmann J, 2000; Londino AV, 1998; Munro R, 1998; Padeh S, 1997; Takeyama J, 2006; Yildirim Y, 2005).

Bei rheumakranken Kindern wurden bis jetzt keine kontrollierten Studien zur Behandlung der MTX-assoziierten Nebenwirkungen mit Folsäure veröffentlicht (Killeen OG, 2006). Die bei Erwachsenen durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass Folsäure insbesondere bei gastrointestinalen Nebenwirkungen (Ortiz Z, 1999) sowie bei einer Hepatotoxizität (Van Ede AE, 2001) einen positiven Effekt haben kann. Eine nicht-kontrollierte retrospektive Untersuchung an 43 JIA-Patienten zeigte eine statistisch signifikante Abnahme der Anzahl von MTX-assoziierten gastrointestinalen und Lebertoxizitätserscheinungen unter einer Supplementierung mit Folsäure (Ravelli A, 1999).

Zum antientzündlichen Wirkungsmechanismus von MTX siehe Kapitel 1.2.

Andere DMARDs

Die meisten kontrollierten Studien fanden keine signifikante Wirksamkeit für **Hydroxychloroquin**, **D-Penicillamin** und **orales Gold** bei der Behandlung einer JIA im Vergleich zu Placebo (Giannini EH, 1993). In einer kontrollierten Studie mit kleiner Patientenzahl konnte geringe Überlegenheit von **Azathioprin** gegenüber Placebo gezeigt werden (Kvien TK, 1986). Eine kontrollierte Studie zeigte eine Wirksamkeit von **Sulfasalazin** bei oligoartikulärer und polyartikulärer JIA (Van Rossum MA, 1998; Van Rossum MA, 2007). In einer kontrollierten Studie bei polyartikulärer JIA war **Leflunomid** weniger wirksam als MTX, aber besser als Placebo (Silverman E, 2005). Zurzeit gilt das Leflunomid als Reservemedikament vor allem bei MTX-Unverträglichkeit. Eine Wirksamkeit von **Cyclosporin A** wurde in einzelnen nicht-

kontrollierten Studien nachgewiesen, vor allem bei systemischer Arthritis, bei MAS, bei therapieresistenter JIA-assoziiierter Uveitis und bei Oligoarthritis (Hashkes PJ, 2005; Stabile A, 2006; Tappeiner C, 2008; Weller F, 2005). In einer Studie wurde eine hohe Wirksamkeit von **Thalidomid** bei refraktärer systemischer Arthritis berichtet (Lehman TJ, 2004). Das Zytostatikum **Chlorambucil** zeigte sich zwar als hochwirksam bei refraktärer JIA, v.a. bei Vorliegen einer Amyloidose, wird aber wegen der Gefahr maligner Komplikationen und einer hohen Sterilitätsrate bei Jungen nur noch ausnahmsweise eingesetzt (Hashkes PJ, 2005).

Biologika

Etanercept ist ein humanisiertes rekombinantes 75kD-Tumornekrosefaktor(TNF)-Rezeptor-Fc-Fusionsprotein. Etanercept bindet TNF und verhindert dadurch dessen Interaktion mit dem membranständigen TNF-Rezeptor, was die intrazelluläre TNF-Wirkung aufhebt. Etanercept ist das einzige Biologikum, das für das Kindes- und Jugendalter zugelassen ist (Indikation: polyartikuläre JIA bei Unwirksamkeit oder Unverträglichkeit von MTX, Stand April 2008).

Die Wirksamkeit von Etanercept konnte in einer doppelblinden, randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie bei 69 Kindern im Alter von 4-17 Jahren mit einer zuvor gegenüber 10mg/m² *KOF/Woche MTX therapierefraktären polyartikulären JIA nachgewiesen werden (Lovell DJ, 2000). In eine offen geführte Anschlussstudie wurden 58 von 69 initialen Studienpatienten aufgenommen, von denen 50 über zwei Jahre, 32 über vier Jahre und 16 über acht Jahre nachbeobachtet wurden (Lovell DJ, 2003; Lovell DJ, 2006; Lovell DJ, 2008). Die Wirkung von Etanercept hielt auch nach 8 Jahren der Therapie an, jedoch musste bei manchen Patienten nach dem ersten Behandlungsjahr zusätzlich Methotrexat, bei einzelnen auch Prednison eingesetzt werden. Auch die Ergebnisse des Deutschen Etanercept-Registers zeigten eine gute Wirksamkeit von Etanercept (Horneff G, 2004).

Die Verträglichkeit der Therapie ist in der Regel gut, schwerwiegende unerwünschte Wirkungen treten selten auf (Gerloni V, 2008; Horneff G, 2008; Lovell DJ, 2008; Prince FH, 2008). Im Deutschen Etanercept-Register wurden bislang einzelne Fälle von Malignomen unter einer Etanercept-Therapie gemeldet (Horneff G, 2008). Außerdem wurden einzelne Fälle von Uveitis bzw. Verschlechterung der schon vorhandenen Uveitis beobachtet (Heiligenhaus A, 2007).

Auch weitere Biologika wie z.B. Adalimumab, Infliximab oder Anakinra werden bei Patienten mit JIA, vor allem bei schweren Verläufen erfolgreich eingesetzt. Dabei handelt es sich jedoch um „Off-Label-Therapien“.

1.1.4. Einschätzung der Erkrankungssituation und Messung des Therapieerfolges

Der aktuelle JIA-bedingte Zustand eines Patienten zu einem gegebenen Zeitpunkt wird von folgenden Faktoren bestimmt (Ringold S, 2007):

- Erkrankungsaktivität (aktive bzw. keine Entzündungsaktivität)
- Funktionelle Möglichkeiten (Einschränkung in alltäglichen Aktivitäten, gesundheitsbezogene Lebensqualität)
- Vorhandensein von irreversiblen Schäden (Gelenkdestruktionen, Gelenkdeformationen, Gelenkoperation bzw. Gelenkersatz, lokale und systemische Wachstumsstörungen, Uveitiskomplikationen, andere extraartikuläre Komplikationen wie z.B. Amyloidose, MAS, etc.).

Zur Beurteilung der Effektivität einer medikamentösen Behandlung wird die Erkrankungssituation hinsichtlich der oben genannten Parameter zu festgelegten Zeitpunkten gemessen, und die Befunde werden ständig miteinander verglichen. Hierdurch können Veränderungen des Erkrankungszustandes

unter der jeweiligen Therapie bzw. der Therapieerfolg über den Beobachtungszeitraum abgeschätzt werden.

Einschätzung der Erkrankungsaktivität

Es werden sechs Variablen zur Einschätzung der Erkrankungsaktivität unterschieden (Kernvariablen) (Giannini EH, 1997):

- Zahl der Gelenke mit einer aktiven Arthritis
- Zahl der funktionell eingeschränkten Gelenke
- Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG)
- Globale Einschätzung der Erkrankungsaktivität mittels 100mm visueller Analogskala (VAS) durch den Arzt
- Globale Einschätzung der Erkrankungssituation mittels 100mm VAS durch die Eltern bzw. den Patienten (falls vom Alter her möglich)
- Einschätzung der Funktionseinschränkung mittels Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ).

Eine **Verbesserung der Erkrankungsaktivität** liegt vor, wenn mindestens 3 der 6 Kernvariablen eine Besserung von mindestens 30% im Vergleich zu den Vorbefunden zeigen und lediglich eine der 3 übrigen Variablen eine Verschlechterung von mehr als 30% aufweist (ACR Pediatric 30-Verbesserungskriterien) (Giannini EH, 1997). ACR Pediatric 30 ist ein validiertes und weltweit akzeptiertes Instrument zur Messung des Therapieerfolges in klinischen Studien der JIA. Das Messinstrument „ACR Pediatric Verbesserungskriterien“ kann variiert werden zu ACR Pediatric 20-, 50-, 70- oder 90-Verbesserungskriterien, je nachdem, ob der Anteil der Patienten mit einer Besserung von mindestens 20%, 50%, 70% bzw. 90% gesucht wird. Jeweils müssen wiederum mindestens 3 von 6 Kernvariablen den geprüften Besserungsgrad aufweisen, wobei lediglich eine von den 3 übrigen Variablen eine Verschlechterung von mehr als 30% zeigen darf (Ringold S, 2007).

Eine **Verschlechterung der Erkrankungsaktivität** liegt vor, wenn 2 der 6 Kernvariablen eine Verschlechterung von mindestens 40% im Vergleich zu den Vorbefunden zeigen und lediglich eine der vier übrigen Variablen eine Besserung von 30% oder mehr zeigt (Brunner HI, 2002).

Die Erkrankung wird als **inaktiv** eingeschätzt, wenn alle folgende Kriterien erfüllt sind: 1)keine aktive Arthritis, 2)keine systemischen Zeichen wie Fieber, Hautausschlag, Serositis, Hepato- bzw. Splenomegalie oder generalisierte Lymphadenopathie, 3)keine aktive Uveitis, 4)normale BKS und CRP, 5)globale Einschätzung der Erkrankungsaktivität durch den Arzt weist auf einen inaktiven Zustand hin (Wallace CA, 2004).

Klinische Remission unter dem Medikament wird definiert als ein Zustand der inaktiven Erkrankung für mindestens 6 aufeinanderfolgende Monate unter einer anti-rheumatischen medikamentösen Therapie (Wallace CA, 2004). **Klinische Remission ohne Medikamente** wird definiert als ein Zustand der inaktiven Erkrankung für mindestens 12 aufeinanderfolgende Monate nach dem Absetzen aller anti-rheumatischen (einschließlich NSAR) und anti-Uveitis Medikamente (Wallace CA, 2004). Die Remissionskriterien sind jedoch noch nicht validiert. Unter anderem bleibt noch zu klären, ob ein wie oben definierter inaktiver Zustand bzw. Remission tatsächlich einer Entzündungsfreiheit entspricht (Ringold S, 2007). So konnte z.B. in der Studie von Brown et al. (2006) bei 96% mit Kernspintomographie untersuchter RA-Patienten, deren Erkrankungszustand ärztlich-klinisch als „inaktiv“ bzw. „in klinischer Remission“ eingeschätzt worden war, eine aktive Synovialitis festgestellt werden.

Einschätzung der funktionellen Möglichkeiten

Der Fragebogen CHAQ ist ein international validiertes Instrument zur Messung der erkrankungsbezogenen **funktionellen Einschränkung** in alltäglichen Aktivitäten (Ruperto N, 2001). Er besteht aus zwei Komponenten: Beurteilung der Funktionseinschränkung (Disability-Index) und Beurteilung der gesamten Erkrankungssituation und der krankheitsbedingten Schmerzen (mittels

100mm VAS). Die **gesundheitsbezogene Lebensqualität** wird vorzugsweise mit dem CHQ (Child Health Questionnaire) (Ruperto N, 2001) oder dem PedsQL (Pediatric Quality of Life Inventory) (Varni JW, 2002) gemessen. Beide Instrumente sind für rheumakranke Kinder validiert.

Es fehlen validierte Messinstrumente zur **Einschätzung der erkrankungsbedingten irreversiblen Schäden** bei JIA. Unter anderem sind die röntgenologischen Merkmale einer destruktiven Arthritis wie Gelenkspaltverengung oder Erosionen wegen der physiologischen Altersunterschiede der Knochen-/Knorpelstruktur bei Kindern nicht selten schwer beurteilbar (Ringold S, 2007).

1.1.5. Outcome der JIA

Das langfristige Outcome der JIA hängt wesentlich von deren Kategorie ab. Die Erkrankung zeigt häufig einen progredienten Verlauf, der zum Teil zu irreversiblen Schäden führt. In den publizierten Studien der letzten 10-15 Jahre variiert die Remissionsrate zwischen 43-73% bei persistierender und 12-35% bei erweiterter Oligoarthritis, 23-46% bei RF-negativer Polyarthritis, 0-15% bei RF-positiver Polyarthritis und 33-80% bei systemischer Arthritis (Adib N, 2005). Dabei handelt es sich um eine „Punkt-Remission“, d.h. die Erkrankungssituation wird zu einem einzigen Erhebungszeitpunkt (am häufigsten der aktuellste ambulante bzw. stationäre Vorstellungstermin) gemessen. In einer Studie an 437 JIA-Patienten untersuchten Wallace et al. die gesamte Zeitdauer bzw. das Zeitverhältnis von aktiven zu inaktiven Erkrankungsphasen (Wallace CA, 2005). Im Mittel während 40% der gesamten Krankheitsdauer (Inter-Quartilabstand (IQR) 16-64%) befanden sich die Patienten im Zustand einer inaktiven Erkrankung, während 4% der Zeit (IQR 0-15%) in Remission unter medikamentöser Therapie, und während 0% der Zeit (IQR 0-16%) in Remission ohne Medikamente, definiert anhand der ACR-Remissionskriterien für die JIA. Insgesamt erreichten 44% der Patienten mindestens einmal den Zustand einer klinischen Remission ohne Medikamente, von denen in 58% die Remission mindestens 1 Jahr lang anhielt, jedoch nur bei 6% der Patienten dauerte die Remission über 5 Jahre. Auch in dieser Studie zeigten die Patienten mit persistierender Oligoarthritis einen günstigeren Erkrankungsverlauf als die mit Polyarthritis.

Bezüglich permanenter Funktionseinschränkungen berichtete eine italienische Studie CHAQ-Scores von >0 (disability) bei 52% und >0,5 (moderate-to-severe disability) bei 21,3% der JIA-Patienten mit einer Krankheitsdauer von mindestens 5 Jahren (Viola S, 2005). Auch die Untersuchungen zur gesundheitsbezogenen Lebensqualität zeigten niedrigere CHQ-Scores bei rheumakranken Kindern im Vergleich zu gesunden Gleichaltrigen (Gutierrez-Suarez R, 2007). Studien an Erwachsenen, die im Kindesalter an JIA erkrankt waren, weisen jedoch auf eine deutlich höhere Häufigkeit von schweren Funktionseinschränkungen (Packham JC 2002; Foster HE, 2003; Mier R, 2006).

1.2. Molekularer Wirkmechanismus von Methotrexat

Methotrexat ist ein strukturelles Analog der Folsäure und kann auf diese Weise in den Folsäurestoffwechsel eingreifen.

Nach einer oralen oder parenteralen Applikation werden MTX und sein Hauptmetabolit 7-OH-MTX relativ rasch aus dem Plasma eliminiert. Die Ausscheidung verläuft biphasisch; die initiale bzw. terminale Halbwertszeit betragen 1,5 – 4 Stunden (Verteilungsphase) bzw. 8 – 15 Stunden (Eliminationsphase) (Balis FM, 1983; Balis FM, 1998; Bannwarth B, 1996; Kremer JM, 1986).

Aus dem Plasma wird MTX rasch von den Zellen aufgenommen. MTX gelangt in den Zellinnenraum durch ein aktives Transportsystem mittels Reduced Folate Carrier-1 (RFC-1), ähnlich wie die natürlich vorkommenden Folate (Kremer JM, 2004). Die Elimination von MTX aus der Zelle erfolgt durch die

Transporterproteine, die zur ATP-binding cassette superfamily (ABC) gehören. Nach heutigem Wissensstand sind Proteine der Klassen ABCC 1-4 und ABCG2 die Haupttransporter von MTX aus der Zelle (Kremer JM, 2004; Ranganathan P, 2006).

Intrazellulär werden an MTX durch das Enzym Folsäurepolyglutamatsynthetase bis zu 6 Glutamylgruppen angehängt (Cutolo M, 2001; Kremer JM, 2004; Cronstein BN, 2005; Ranganathan P, 2006). Im Gegensatz zu MTX können MTX-Polyglumate (MTXPGs) über die Transportsysteme aus der Zelle nicht eliminiert werden. Das Enzym γ -Glutamylhydrolase (GGH) katalysiert die Abspaltung des Glutaminrestes von MTXPG und ermöglicht somit die Eliminierung von MTX aus der Zelle (Kremer JM, 2004).

Der genaue Wirkungsmechanismus von MTX bei einer niedrig-dosierten wöchentlichen Therapie bleibt bis jetzt unklar. Es wurden unterschiedliche Hypothesen aufgestellt (Cutolo M, 2001; Kremer JM, 2004; Cronstein BN, 2005; Wessels JA, 2008). Dabei werden die MTXPGs als biologisch aktive Form von MTX betrachtet (Cutolo M, 2001). Den MTXPGs wird ein großer Stellenwert im Wirkmechanismus von MTX zugeschrieben, weil die polyglutamylierten Formen länger als das native MTX in der Zelle verbleiben und stärker als MTX die Enzyme des Folatstoffwechsels wie Dihydrofolatreduktase (DHFR), Thymidylatsynthetase (TS) und Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonukleotid(AICAR)-Transformylase (ATIC) inhibieren (Kremer JM, 2004).

Das Enzym DHFR reduziert Dihydrofolsäure (DHF) zu Tetrahydrofolsäure (THF), welche zur Bildung der biologisch aktiven Folat-Kofaktoren wie z.B. 5,10-Methylen-tetrahydrofolsäure (5,10-Methylen-THF) benötigt wird. 5,10-Methylen-THF ist der Hauptdonator von Methylgruppen für zahlreiche zelluläre Methylierungsreaktionen sowie ein wichtiges Substrat zur Synthese von Purin- und Pyrimidinbasen. DHFR wird sowohl von MTX, als auch von MTXPGs inhibiert, dabei sind die MTXPGs stärkere Hemmer (Kremer JM, 2004). Die Hemmung der DHFR bewirkt einen Mangel an THF und an 5,10-Methylen-THF in der Zelle.

Das Enzym TS katalysiert die Umwandlung von Desoxy-Uridinmonophosphat (dUMP) in Desoxy-Thymidinmonophosphat (dTMP) in der *de novo* Pyrimidinsynthese; dabei dient die 5,10-Methylen-THF als Methylgruppendonator. TS wird sowohl direkt von MTXPGs als auch indirekt durch den MTX-induzierten intrazellulären Mangel an 5,10-Methylen-THF inhibiert (Kremer JM, 2004). Die TS-Hemmung führt zu einem intrazellulären dTMP-Defizit, wodurch vermehrt Uracil anstelle von Thymin in die Nukleinsäure eingebaut wird, so dass es zu multiplen DNA-Schäden kommen kann (Blount BC, 1997). Dies kann die DNA-Synthese sowie die Kapazität des DNA-Reparatursystems deutlich einschränken und zu Störungen der Zellproliferation führen (Cutolo M, 2001). Dabei werden vor allem rasch proliferierende Gewebe betroffen, weil diese gegenüber Störungen der DNA-Synthese besonders empfindlich sind.

Auch das Enzym ATIC wird sowohl direkt von MTXPGs als auch indirekt durch den zellulären Mangel an 5,10-Methylen-THF inhibiert. ATIC benötigt für seine Funktion als Kofaktor 10-Formyl-THF. Diese wird aus der 5,10-Methylen-THF gebildet und ist ein essenzielles Kofaktor für die *de novo* Purinsynthese. Durch die Hemmung von ATIC wird die Purinbiosynthese auf der Stufe von AICAR blockiert, was zur intrazellulären Akkumulation von AICAR führt. Da AICAR eine Hemmung von Adenosinstoffwechselenzymen wie Adenosin-desaminase und Adenosinmonophosphat-desaminase bewirkt, kommt es infolge der intrazellulären AICAR-Akkumulation zu einer Erhöhung der Adenosin-Konzentration im Zellinnenraum und auch extrazellulär. Adenosin ist dabei eine starke entzündungshemmende Substanz (Chan ES, 2007).

Nach derzeitigem Wissensstand wird die antientzündliche/immunmodulatorische Wirkung von MTX sowohl durch die folatabhängigen als auch durch die folatunabhängigen Mechanismen vermittelt (Cutolo M, 2001; Kremer Cronstein BN, 2005; Wessels JA, 2008).

MTX inhibiert die Proliferation der aktivierten T-Zellen und induziert eine Apoptose dieser Zellen, vermutlich infolge einer verminderten *de novo* Bildung von Pyrimidinnukleotiden, aber auch durch die

erhöhte Produktion und eine verringerte Elimination von reaktiven Sauerstoffradikalen (es wird vermutet, dass MTX indirekt eine Hemmung der Enzyme der Polyaminsynthese, unter anderem der von Spermin- bzw. Spermidinsynthese, bewirkt; die beiden Polyamine zählen dabei zu den wichtigsten Sauerstoffradikalfängern), durch die MTX-induzierte erhöhte CD95-Sensitivität der aktivierten T-Zellen (CD95 gehört zur Familie der Todesrezeptoren, die eine Apoptose vermitteln können), sowie durch die indirekte Hemmung des Enzyms Isoprenylcystein-Karboxyl-Methyltransferase (diese katalysiert unter anderem auch die Methylierung des Ras-Proteins, eines zentralen Proteins verschiedener Signaltransduktionswege, die Wachstums- und Differenzierungsprozesse der Zelle regulieren; eine signifikant reduzierte Methylierung des Ras-Proteins unter MTX konnte in einer Studie nachgewiesen werden) (Cutolo M, 2001; Wessels JA, 2008).

Zudem kann MTX die Zytokinproduktion bzw. Zytokinsekretion (vor allem die von Interleukin(IL)-4, IL-6, IL-13, TNF, Interferon- γ und Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierenderfaktor) aktivierter T-Lymphozyten inhibieren. Vermutlich entsteht diese Hemmung infolge der Wirkung von MTX auf die Purin- bzw. Pyrimidinsynthese, womöglich auch durch die Inhibition der Aktivierung des Nukleärer-Faktor-kappa-B(NF κ B)-Signalweges (Wessels JA, 2008).

Außerdem kann MTX (vermutlich durch Adenosin vermittelt) eine vermehrte Bildung des IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL1Ra) bzw. des löslichen TNF-Rezeptors (sTNFR) induzieren (Cutolo M, 2001). Die Expression von Fc-gamma-Rezeptoren der Klassen I und IIA (Fc γ RI und Fc γ RIIA) auf der Zelloberfläche von Monozyten wird ebenso herabreguliert, somit wird die durch Immunkomplexe induzierte Monozytenaktivierung blockiert. Dieses führt zur Hemmung der Phagozytose, der Antigenpräsentation, der Zytokinproduktion (vor allem von TNF und IL-1) und der Produktion von Metalloproteinasen (Wessels JA, 2008).

Die durch MTX induzierte vermehrte Bildung von Adenosin und erhöhte extrazelluläre Adenosinkonzentrationen stellen einen weiteren Mechanismus für die antientzündliche Wirkung von MTX dar. Adenosin ist eine vielseitig wirkende stark entzündungshemmende Substanz. Adenosin induziert seine antiinflammatorische Effekte, indem es die Adhärenz der neutrophilen Granulozyten an das Endothel und somit deren Chemotaxis ins entzündliche Gewebe sowie die Phagozytose hemmt (Chan ES, 2007). Außerdem wird die Produktion der proinflammatorisch wirkenden Zytokine wie IL-8, IL-12 und TNF von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen gehemmt, hingegen steigt die Bildung der antiinflammatorisch wirkenden Zytokine wie IL-6 und IL-10 (Chan ES, 2007; Wessels JA, 2008).

Für die MTX-induzierte Toxizität scheinen sowohl die antiproliferative Wirkung (vor allem auf die rasch proliferierenden Zellen des Knochenmarks oder der Schleimhäute) als auch die MTX-bedingte Homozysteinämie von Bedeutung zu sein (Kremer JM, 2004). MTX beeinflusst den Homozysteinstoffwechsel, indem es einen Mangel an 5-Methyl-THF, dem Kohlenstoffdonor für die Remethylierungsreaktion von Homozystein zu Methionin, induziert. Somit kommt es zur Inhibition der Methioninsynthese und zur Erhöhung der Homozysteinkonzentration.

1.3. Pharmakogenetik und Pharmakogenomik

Die Patienten unterscheiden sich im Ansprechen auf eine Arzneimitteltherapie. Einige Patienten sprechen auf eine bei anderen wirksame Behandlung möglicherweise nicht an, bei anderen kommt es zu unerwünschten Wirkungen eines Medikamentes. Das individuelle Ansprechen auf Arzneimittel hängt dabei von mehreren Faktoren ab. Es kann durch Alter, Geschlecht, Morbidität und Komorbidität, Organfunktion (vor allem Leber- und Nierenfunktion), Begleitmedikamente, Ernährung und

Umweltfaktoren, aber auch durch den genetischen Hintergrund eines jeden Patienten beeinflusst werden.

Der so genannte „Einzelnukleotid-Polymorphismus“ (*engl.*: single nucleotide polymorphism, SNP) stellt die häufigste Form inter-individueller genetischer Variabilität dar (Brookes AJ, 1999). Ein SNP beschreibt einen Austausch eines einzelnen Nukleotids an einer bestimmten Position der DNA-Sequenz. Dabei liegt die Häufigkeit des Variant-Allels in der Population über 1% (liegt die Allelhäufigkeit unter 1%, spricht man von einer Mutation). SNPs treten überall im menschlichen Genom durchschnittlich alle 1000 Basen auf. Bis heute wurden ca. 4 Millionen SNPs identifiziert und an die Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) übermittelt. Es werden zwei Arten von SNP unterschieden: synonyme („stille“ SNP, ohne funktionelle Bedeutung) und nicht-synonyme SNP. Liegt ein nicht-synonymer SNP im Bereich der kodierenden Sequenz (cSNP), kann dies zu funktionellen Veränderungen der kodierten Struktur führen. Typischerweise kommt es infolge eines nicht-synonymen cSNP zum Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz mit der Folge einer Funktionsverminderung bis hin zum kompletten Funktionsverlust des kodierten Proteins. Liegt ein nicht-synonymer SNP im Promotorbereich eines Gens, kann es zu regulatorischen Veränderungen der Transkription kommen.

Dementsprechend können genetische Polymorphismen, welche z.B. Medikamentenstoffwechselenzyme, Transporterproteine (wie P-Glykoproteine, etc.) sowie Zielstrukturen betreffen, die Verstoffwechselung von Medikamenten beeinflussen und somit zu individuell unterschiedlichen Reaktionen auf Arzneimitteln führen (Evans WE, 2003; Weinshilboum R, 2003).

Pharmakogenetik beschäftigt sich mit der Erforschung, inwieweit die einzelnen Gen-Polymorphismen, die an der Arzneimittelverstoffwechselung beteiligt sind, die Variabilität des Therapieansprechens beeinflussen (Tsai YJ, 2002).

Pharmakogenomik beschäftigt sich mit der Erforschung, inwieweit die Zusammen- bzw. Wechselwirkungen von mehreren Genpolymorphismen, die gleichzeitig unterschiedliche Aspekte einer Arzneimitteltherapie betreffen, also Medikamentenabsorption, -distribution, -stoffwechsel, -exkretion sowie Rezeptor-Affinität, das Therapieansprechen beeinflussen können (Tsai YJ, 2002).

1.4. Pharmakogenetik und Pharmakogenomik von Methotrexat

Die therapeutische Wirkung von MTX beruht zu einem gewissen Teil auf der Hemmung der Folatstoffwechselenzyme bzw. auf die Folatdepletion. Theoretisch können die Genpolymorphismen, welche die Folattransporter und Folatstoffwechselenzyme betreffen, die Pharmakokinetik bzw. Pharmakodynamik von MTX beeinflussen. Zahlreiche Genpolymorphismen der am Folatstoffwechsel beteiligten Strukturen wurden in den letzten 20 Jahren hinsichtlich potentieller Einflüsse auf die MTX-Therapie untersucht. In einigen Studien konnten Zusammenhänge zwischen einzelnen Genpolymorphismen und der Effektivität bzw. Toxizität einer MTX-Therapie bei Leukämie, chronisch-entzündlichen und rheumatischen Erkrankungen nachgewiesen werden, andere Studien fanden hingegen keine signifikanten Assoziationen (Ranganathan P, 2006; Ranganathan P, 2008). *Tabelle 2* gibt einen Überblick über die untersuchten SNPs und deren vermutete Effekte auf die MTX-Therapie.

Tabelle 2: Genpolymorphismen, die die Wirkung von MTX beeinflussen können

Gen	Funktion der kodierten Struktur in Bezug auf MTX	SNP	*Funktionelle Bedeutung des SNP	*Klinische Bedeutung des SNP	Referenzen
RFC-1	Transport von MTX in die Zelle	G80A	Erhöhte Transkription → erhöhte Expression bzw. erhöhte Aktivität des RFC	Erhöhter MTX-Transport in die Zelle, höhere MTX-Wirksamkeit	(Dervieux T, 2004)
ABCB1	Elimination von MTX aus der Zelle	C3435T	Verminderte Expression von P-Glykoprotein	Verminderte MTX-Elimination aus der Zelle, höhere Wirksamkeit der MTX-Therapie	(Pawlik A, 2004)
DHFR	Synthese von THF aus DHF	C829T in der 3'-UTR	Erhöhte DHFR-Expression	Evtl. negativer Einfluss auf die MTX-Wirksamkeit	(Ranganathan P, 2008), (Goto Y, 2001)
TS	Bildung von dTMP aus dUMP in der <i>de novo</i> Synthese von Thymin	3-fache Wiederholung einer 28bp-Sequenz in der 5'-UTR mit Enhancer-Funktion (TSER *3/*3)	Erhöhte Transkription → erhöhter TS-Spiegel, erhöhte TS-Enzymaktivität	MTX-Wirkungsverminderung. Evtl. bessere MTX-Verträglichkeit	(Dervieux T, 2004), (Kumagai K, 2003), (Weisman MH, 2006)
		Deletion einer 6bp-Sequenz in der 3'-UTR	Verminderte TS-Expression → verringerte TS-Aktivität bzw. -Stabilität	Erhöhte MTX-Wirksamkeit	
ATIC	Bildung von 10-formyl-AICAR aus AICAR	C347G	Verminderte ATIC-Aktivität → AICAR-Akkumulation in der Zelle → erhöhter Adenosin-Spiegel intra- und extrazellulär	Erhöhte MTX-Wirksamkeit Erhöhte MTX-Toxizität	(Dervieux T, 2004), (Weisman MH, 2006)
GGH	Abspaltung der Glutamatreste von MTXPGs	C401T in der Promotorregion	erhöhter Abbau von MTXPGs mit einer Verminderung der MTX- Retention in der Zelle	Niedrigere intrazelluläre MTXPG-Spiegel → evtl. negativer Einfluss auf die MTX-Wirksamkeit	(Dervieux T, 2004), (Cheng Q, 2004)
		C452T	Verminderte Bindungs-Affinität von GGH zu MTXPG, verringerte GGH-Enzymaktivität	Erhöhte intrazelluläre MTXPG-Spiegel → evtl. positiver Einfluss auf die MTX-Wirksamkeit	
MTHFR	Bildung von 5-Methyl-THF aus 5,10-Methylen-THF	C677T	Thermolabiles Enzym mit verminderter Aktivität bei Temperaturen $\geq 37^{\circ}\text{C}$	Erhöhte Homozysteinspiegel Erhöhte MTX-Toxizität	<i>Siehe Kapitel 1.6.1</i>
		A1298C	Verminderte Enzymaktivität	Erhöhte MTX-Wirksamkeit Bessere MTX-Verträglichkeit	
SHMT	Koenzym in der Synthese von 5,10-Methylen-THF	C1420T	Erhöhte SHMT-Enzymaktivität	MTX-Wirkungsverminderung Bessere MTX-Verträglichkeit	(Weisman MH, 2006), (Dervieux T, 2006)
MS	Remethylierung von Homozystein zu Methionin	A2756G	Erhöhte MS-Enzymaktivität	Bessere MTX-Verträglichkeit	(Dervieux T, 2006), (Chen J, 2001), (Harmon DL, 1999)
MTRR	Methylierung von Kobalamin-Kofaktor, welche für die Funktion von MS benötigt wird	A66G	Verminderte MTRR-Aktivität	Erhöhte Homozysteinspiegel Erhöhte MTX-Toxizität	(Dervieux T, 2006), (Wilson A, 1999), (Gaughan DJ, 2001)

*Funktionelle Veränderungen bei Variant-Allel bzw. Variant-Genotyp gegenüber dem Wildtyp. RFC-1 = reduced folate carrier; ABCB1 = adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) superfamily transporter B1 („multidrug resistance protein“ (MDR), P-Glykoprotein); DHFR = Dihydrofolatreduktase; TYMS = Thymidylatsynthetase; ATIC = Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonucleotid (AICAR)-Transformylase; MTHFR = Methylenetetrahydrofolatreduktase; GGH = γ -Glutamylhydrolase; SHMT = Serinhydroxymethyltransferase; MS = Methioninsynthase; MTRR = Methioninsynthasereduktase; DHF = Dihydrofolsäure; THF = Tetrahydrofolsäure; dUMP = Desoxy-Uridynmonophosphat; dTMP = Desoxy-Thymidinmonophosphat; AICAR = Aminoimidazol-Carboxamid- Ribonukleotid; 3'-UTR = 3'-untranslated region; 5'-UTR = 5'-untranslated region; MTXPG = MTX-Polyglutamate.

Modifiziert nach (Ranganathan P, 2006).

1.5. Methylentetrahydrofolat-Reduktase

5,10-Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR; EC 1.5.1.20) ist ein Schlüsselenzym des Folatmetabolismus. MTHFR katalysiert die Reduktion von 5,10-Methylen-THF zur 5-Methyl-THF. 5-Methyl-THF ist der wichtigste Kohlenstoff-Donator in der Remethylierung von Homocystein zu Methionin durch das Enzym Methioninsynthase (MS). Aus Methionin entsteht im weiteren Verlauf S-Adenosyl-L-Methionin (SAM), der wichtigste Methylgruppendonator für zahlreiche intrazelluläre Methylierungsreaktionen einschließlich DNA-Methylierung. Die wichtigste Funktion von MTHFR ist das Aufrechterhalten des Gleichgewichtes im folatabhängigen Ein-Kohlenstofftransfer zwischen der *de novo* Nukleotidsynthese (das Substrat von MTHFR, 5,10-Methylen-THF dient als Kohlenstoffeinheitenlieferant für die Synthese der Purinnukleotide und des Thymins) und Methylierungsreaktionen (das Produkt der MTHFR, 5-Methyl-THF, dient als Kohlenstoffeinheitenlieferant in der Synthese von SAM).

Infolge einer Verminderung der MTHFR- Enzymaktivität kommt es zu einem erhöhten 5,10-Methylen-THF-Spiegel intrazellulär, einem verringerten 5-Methyl-THF-Spiegel in der Zelle und im Serum, zu einem Mangel an SAM bzw. zur Abnahme der Methylierungskapazität, darunter auch zur DNA-Hypomethylierung, sowie zu einem erhöhten Homozystein-Plasmaspiegel, wobei der Schweregrad der Veränderungen von der Restenzymaktivität sowie vom Folatstatus abhängt (Ashfield-Watt PA, 2002; Castro R, 2004; Friso S, 2002; Gueant-Rodriguez RM, 2006; Guinotte CL, 2003; Guttormsen AB, 1996; Stern LL, 2000). Ausgeprägte Aktivitätsverminderungen haben schwere neurologische, kardiovaskuläre bzw. Gerinnungsstörungen zur Folge. Hingegen könnte eine leichte Aktivitätsverringerung, z.B. infolge eines bestimmten genetischen Polymorphismus, bei ausreichendem Folatstatus unter Umständen sogar von Vorteil sein, weil einerseits keine eindeutigen Veränderungen im Folatstoffwechsel entstehen, andererseits wird die Nukleotidbiosynthese durch einen erhöhten 5,10-Methylen-THF-Spiegel begünstigt, somit nimmt auch die DNA-Replikations- bzw. Reparaturkapazität zu (Munoz-Moran E, 1998; Schneider JA, 1998).

1.5.1. MTHFR-Genpolymorphismus

Das Gen der MTHFR befindet sich auf dem Chromosom 1 am Locus 1p36.3 (Goyette P, 1994) und umfasst 11 Exons (Goyette P, 1998). Es wurden mehrere Polymorphismen im MTHFR-Gen beschrieben. Martin et al. führten 2006 eine komplette Sequenzierung des humanen MTHFR-Gens bei 240 Individuen aus vier ethnischen Gruppen mit jeweils 60 Personen pro Gruppe durch. Es wurden insgesamt 65 Polymorphismen entdeckt, 11 davon waren nicht-synonyme SNPs in der kodierenden Region, welche einen Aminosäureaustausch in der kodierten Proteinsequenz bewirkten. Es wurden 18 unterschiedliche Allozyme (Variant-Enzyme) identifiziert, dabei besaßen einige davon bis zu 3 Variant-Aminosäuren. Die Enzymaktivität der Allozyme zeigte erhebliche Schwankungen mit 13% bis 149% der Aktivität des normalen Enzyms. Die Proteinspiegel schwankten von 31% bis 120% im Vergleich zum Wildtyp und korrelierten stark mit der Enzymaktivität. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass eine quantitative Veränderung der Protein-Expression den Hauptmechanismus darstellt, mit dem die MTHFR-SNPs die Genfunktion beeinflussen.

Von den bis heute identifizierten SNPs im MTHFR-Gen kommen die C677T- und A1298C-Polymorphismen besonders häufig vor.

1.5.1.1. Einzelnukleotid-Polymorphismus C677T

Der am häufigsten vorkommende SNP im MTHFR-Gen ist der Nukleotidaustausch Cytosin gegen Thymin (C→T) an der Position 677 im Exon 4 (rs1801133, 677C>T) (Frosst P, 1995). Dieser SNP führt zu einem

Austausch von Alanin durch Valin in der N-terminalen katalytischen Domäne des Enzyms, an der Position 222 der Proteinsequenz (p.A222V). Hierdurch entsteht ein thermolabiles Enzym mit reduzierter Enzymaktivität bei Temperaturen $\geq 37^{\circ}\text{C}$. Bei Heterozygoten für das 677T-Allel ist die Enzymaktivität bei 37°C etwa um 50% und bei Homozygoten um 70% vermindert (Frosst P, 1995). Bei Individuen mit dem 677TT-Genotyp kommt es zu einer milden Hyperhomozysteinämie, vor allem bei gleichzeitigem Folsäuremangel (Ashfield-Watt PA, 2002; Gueant-Rodriguez RM, 2006; Guinotte CL, 2003; Guttormsen AB, 1996). Außerdem konnte in einzelnen Studien eine Abnahme der DNA-Methylierung bei 677TT-Individuen gezeigt werden (Castro R, 2004; Friso S, 2002; Stern LL, 2000). In optimalen Konzentrationen scheint die Folsäure das thermolabile Enzym stabilisieren zu können (Jacques PF, 1996). So kam es bei Individuen mit dem 677TT-Genotyp zur deutlichen Verringerung bzw. Normalisierung des Homozystein-Plasmaspiegels unter einer Supplementierung mit Folsäure in allgemein empfohlener Tagesdosis (Ashfield-Watt PA, 2002; Guinotte CL, 2003; Guttormsen AB, 1996;).

Der C677T Polymorphismus wurde weltweit gefunden, zeigte aber erhebliche ethnische Unterschiede in der Häufigkeit mit 42-49% in lateinamerikanischen Populationen, bis 45% bei Nativamerikanern, 25-44% bei Kaukasiern, 14% bei Schwarzamerikanern und 7% bei Schwarzafrikanern (Barber R, 2000; Botto LD, 2000; Schneider JA, 1998; Wilcken B, 2003). Ähnliche Unterschiede werden auch bezüglich der Häufigkeit vom TT-Genotyp berichtet mit $< 2\%$ bei Schwarzamerikanern und Afrikanern, 8-26% bei Kaukasiern und 20-32% in den nativamerikanischen und lateinamerikanischen Populationen. Für deutsche Populationen wurden die Häufigkeit des 677T-Allels und des TT-Genotyps mit 24,5% (95%CI 20,7-28,1%) bzw. mit 7,8% (95%CI 4,5-11,1%) angegeben (Botto LD, 2000). Es scheint ein geographisches Gefälle zu bestehen mit einem Nord-Süd Anstieg der 677T-Allelhäufigkeit in Europa (Wilcken B, 2003). Als ein möglicher Grund dafür wird eine Gen-Nutrient-Interaktion, in diesem Fall eine Wechselwirkung zwischen dem C677T-SNP und Folsäure vermutet. Die durchschnittliche tägliche Folataufnahme mit der Nahrung ist in Nord-Europa im Allgemeinen niedriger als in den Mittelmeerländern. Einzelne Studien fanden eine starke Korrelation zwischen der Folataufnahme und der Häufigkeit des 677T-Allels in einzelnen europäischen Ländern (Gueant-Rodriguez RM, 2006). Bei einem optimalen Folatstatus wird die Wirkung des C677T-SNP neutralisiert. Dabei könnte das Vorhandensein des T-Allels sogar von Vorteil sein (Munoz-Moran E, 1998; Schneider JA, 1998). Die außergewöhnlich hohe Prävalenz des 677T-Allels in geographischen Regionen mit einer traditionell hohen Folataufnahme wie z.B. Süditalien könnte zum Teil durch diese zwei Faktoren erklärt werden (Gueant-Rodriguez RM, 2006).

Je eine Studie aus Spanien bzw. aus den Niederlanden fanden, dass das 677T-Allel und der 677TT-Genotyp in der Population bei < 20 -Jährigen häufiger vorkommen als bei Individuen im Alter von > 40 Jahren (Munoz-Moran E, 1998; Heijmans BT, 1999). In Spanien wird seit 1982 eine Folsäuresupplementierung während der Schwangerschaft zur Neuralrohrdefektprophylaxe standardmäßig durchgeführt. Diesbezüglich stellten Munoz-Moran et al. die Hypothese auf, dass eine Folsäuresupplementierung während der Schwangerschaft die Überlebensfähigkeit eines Fötus mit dem 677TT-Genotyp erhöhen kann (Munoz-Moran E, 1998).

Mehrere Studien fanden eine Assoziation des C677T-Polymorphismus mit einem erhöhten Risiko für eine koronare Herzerkrankung einschließlich Herzinfarkten (Klerk M, 2002), mit Schlaganfällen (Casas JP, 2004; Kelly PJ, 2002), arteriellen und venösen Thrombosen (Casas JP, 2004; Li X.-M., 2002), angeborenen Anomalien wie Neuralrohrdefekte oder Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (Botto LD, 2002; Kirke PN, 2004; McDermott AP, 2003; Mills JL, 1999; Richter B, 2001), mit Schwangerschaftskomplikationen bzw. spontanen Schwangerschaftsabbrüchen (Isolato PA, 2000; Sohda S, 1997; Zetterberg H, 2002), mit Morbus Down (Hobbs CA, 2000; James SJ, 1999), Malignomen (Boccia S, 2008), psychiatrischen Erkrankungen (Gilbody S, 2007) wie Depressionen, pathologische Angstzustände, Schizophrenie etc., Migräne mit Aura (Kowa H, 2000; Scher AI, 2006) oder mit primärem Offenwinkelglaukom (Junemann AG, 2005). Diese Assoziationen konnten jedoch nicht in allen Studien reproduziert werden (Akar N, 2001; Ananth CV, 2007; Barber R, 2000; Goddard KA, 2007; Meisel C, 2001; Shaw GM, 1998).

1.5.1.2. Einzelnukleotid-Polymorphismus A1298C

Der zweithäufigste Polymorphismus des MTHFR-Gens ist der Nukleotidaustausch Adenosin gegen Cytosin an der Position 1298 in Exon7 (rs1801131; 1298A>C)(Van der Put NM, 1998). Der SNP führt zu einem Austausch der Aminosäure Glutamin durch Alanin in der C-terminalen regulatorischen Domäne des Enzyms an der Position 429 der kodierten Proteinsequenz (E429A). Auch dieser SNP ist mit einer verminderten Enzymaktivität assoziiert, homozygote Individuen besitzen etwa 60% der Enzymaktivität von Normalpersonen (Lievers KJ, 2001). Der SNP in hetero- oder homozygotem Zustand allein führt offenbar nicht zu einer Erhöhung der Homozystein-Serumkonzentration (Dekou V, 2001; Lievers KJ, 2001; Van der Put NM, 1998). Bezüglich einer Assoziation mit Krankheiten oder pathologischen Zuständen liegen wenige und widersprüchliche Daten vor.

Der Polymorphismus tritt bei allen ethnischen Gruppen auf, jedoch nicht gleichmäßig verteilt. Die 1298C-Allelfrequenz wird bei der europäischen bzw. bei der nordamerikanischen Bevölkerung auf ca. 33% geschätzt (Botto LD, 2000; Gilbody S, 2007). Bei Kaukasiern in Europa und Nordamerika beträgt die Häufigkeit des homozygoten 1298CC-Genotyps 8-12%, in hispanischen Populationen 4-5% und bei Asiaten 1-4% (Botto LD, 2000; Gilbody S, 2007).

1.5.1.3. C677T - A1298C kombinierte Varianten

Individuen, die kombiniert-heterozygot für beide SNPs sind, repräsentieren etwa 20% der kaukasischen Bevölkerung (Ogino S, 2003) und weisen etwa 50-60% der Enzymaktivität von Normalpersonen auf (Van der Put NM, 1998). Ob der kombiniert heterozygote Genotyp 677CT-1298AC im Vergleich mit dem 677CT-1298AA Genotyp auch zu erhöhten Homozystein- und erniedrigten Folat-Serumspiegeln führt, wird kontrovers diskutiert. In einigen Studien konnten eine signifikant reduzierte Enzymaktivität und ein erhöhter Homozystein-Plasmaspiegel bei kombiniert Heterozygoten nachgewiesen werden (Castro R, 2003; Ogino S, 2003; Van der Put NM, 1998), andere fanden hingegen keine eindeutigen Veränderungen (Dekou V, 2001; Meisel C, 2001; Yamada K, 2001).

Bei kombiniert Heterozygoten treten beide Polymorphismen in den meisten Fällen nicht auf demselben Chromosom („cis“ Zustand) auf, sondern auf verschiedenen Chromosomen (in „trans“). Der 677T-1298C-Haplotyp in „cis“ kommt selten vor. In einer Metaanalyse von 16 Studien an insgesamt 5389 gesunden Kaukasiern berechneten Ogino et al. (2003) die erwarteten Häufigkeiten mit 37% für den 677C-1298A-Haplotyp, mit 31% für 677C-1298C, mit 32% für 677T-1298A bzw. mit 0,23% bis 0,34% für den 677T-1298C-Haplotyp. Somit besteht ein starkes Linkage Disequilibrium zwischen den beiden Polymorphismen, sodass das 677T-Allel fast immer zusammen mit dem 1298A-Allel und das 1298C-Allel zusammen mit dem 677C-Allel auftritt. Obwohl eine Studie von einer erhöhten Frequenz der 677T-1298C *cis*-Kombination bei Feten von spontanen bzw. therapeutisch indizierten Schwangerschaftsabbrüchen berichtete (Isolato PA, 2000), liegen derzeit keine eindeutigen Beweise dafür vor, dass diese Kombination eine signifikant nachteilige Auswirkung auf die Überlebensfähigkeit eines Fötus hätte. Selten wurde die 677T-1298C-Kombination auch bei gesunden Individuen im Kindes- bzw. Erwachsenenalter gefunden (Aplenc R, 2005; Isolato PA, 2000; Schnakenberg E, 2005; Volcik KA, 2001). Extrem selten kommt die Kombination beider Varianten auch in homozygoter Form vor. In einigen Orten (in England bzw. in Kanada) wurde die 677TT-1298CC-Kombination signifikant häufiger als erwartet gefunden (Isolato PA, 2000; Dekou V, 2001), es könnte sich dabei um einen Gründereffekt handeln.

1.6. Wechselwirkung zwischen MTX und MTHFR

Obwohl die MTHFR von MTX direkt nicht gehemmt wird, besteht eine Wechselwirkung zwischen den beiden. MTX hemmt die MTHFR-Funktion indirekt, indem es einen Mangel an 5,10-Methylen-THF induziert. Darüber hinaus kann eine Verminderung der MTHFR-Enzymaktivität zu Störungen des Folatstoffwechselgleichgewichtes führen und hierdurch die Sensitivität gegenüber den Antifolaten wie MTX beeinflussen (Kremer JM, 2006).

So entsteht infolge der Verminderung der MTHFR-Enzymaktivität eine intrazelluläre Akkumulation von 5,10-Methylen-THF, welche unter anderem auch zur Bildung von dTMP aus dUMP durch TS benötigt wird. Hierdurch steigt die Kapazität der DNA-Synthese (Munoz-Moran E, 1998; Schneider JA, 1998). Dies könnte kompetitiv zur MTX-bedingten TS-Hemmung wirken und die antiproliferative Wirkung von MTX reduzieren.

Außerdem besteht bei MTHFR-Defizit eine verringerte Bildung von 5-Methyl-THF, die als Methylendonator für die Remethylierung von Homozystein zu Methionin dient. Es kommt unter Umständen zur Abnahme der Remethylierung von Homozystein und zur Erhöhung der Homozysteinkonzentration. Diese könnte bei einer gleichzeitigen Therapie mit MTX verstärkt werden. Hierdurch könnte es vermehrt zu MTX-assoziierten Nebenwirkungen kommen.

1.6.1. MTHFR-Genpolymorphismen und niedrig-dosierte MTX-Therapie: Stand der Forschung

Zahlreiche Studien untersuchten die Zusammenhänge zwischen C677T- bzw. A1298C-Genpolymorphismus und der Wirksamkeit bzw. Verträglichkeit einer MTX-Therapie bei Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen. Den rheumatischen Formenkreis betreffend wurden die meisten Studien bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) durchgeführt.

Die bislang einzige Untersuchung bei JIA wurde bei 58 Patienten von Schmelting et al. (2005) veröffentlicht. Die Autoren fanden eine Assoziation zwischen MTX-Toxizität und dem MTHFR C677T-Polymorphismus. Bei Patienten mit dem heterozygoten Genotyp 677CT traten Nebenwirkungen wie Übelkeit, Ekelgefühl, Erbrechen, Transaminasenerhöhung häufiger auf (65%) als bei Patienten mit dem homozygoten Genotyp 677CC (31%). Die nur 3 Patienten mit dem 677TT-Genotyp zeigten jedoch keine Nebenwirkungen. Der A1298C-SNP war mit der klinischen Effektivität der MTX-Therapie assoziiert, die Verbesserungsrate der Aktivitätsparameter wie Anzahl der geschwollenen und eingeschränkten Gelenke sowie Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und C-reaktives Protein (CRP) war bei 1298C-Allelträgern höher im Vergleich zu Patienten mit dem 1298AA-Genotyp.

Haagsma CJ, et al. (1999) fanden bei RA-Patienten (n=105) mit einem 677T-Allel gehäuft Homocysteinämien unter einer MTX-Therapie im Vergleich zu 677CC-Patienten. Dabei hatten die 677TT-Patienten schon vor Beginn der MTX-Therapie höhere Homozystein-Serumspiegel als 677CT- bzw. 677CC-Patienten. Erhöhte Homozysteinspiegel waren mit einem gehäuftem Auftreten von gastrointestinalen Nebenwirkungen assoziiert. Es ergab sich jedoch kein Zusammenhang zwischen dem C677T-Polymorphismus selbst und dem Auftreten von MTX-induzierten Nebenwirkungen.

Auch Van Ede et al. (2002) zeigten, dass eine MTX-Therapie sowohl bei Patienten mit als auch ohne 677T-Allel zu einer Erhöhung der Serum-Homozysteinkonzentration führt. Auch hier wiesen Patienten mit dem 677TT-Genotyp schon vor Beginn der MTX-Therapie erhöhte Homozystein-Serumspiegel auf. Patienten, die begleitend zu ihrer MTX-Therapie eine Folsäuresubstitution erhielten, zeigten eine signifikant mildere bzw. keine Erhöhung der Homozysteinkonzentration im Vergleich zu Placebo-Patienten. Es ergab sich kein Zusammenhang zwischen dem Homozysteinspiegelanstieg unter MTX und der Wirksamkeit bzw. Toxizität der MTX-Therapie.

In einer anderen Studie untersuchten Van Ede et al. (2001) eine mögliche Assoziation des C677T-SNP mit unerwünschten Wirkungen einer MTX-Therapie bei 236 RA-Patienten mit (n=157) oder ohne (n=79) Supplementierung von Folsäure bzw. Folinsäure. Bei 57 Patienten musste die MTX-Therapie wegen

Nebenwirkungen frühzeitig abgesetzt werden. Das Vorhandensein eines 677T-Allels war mit erhöhtem Risiko für einen Behandlungsabbruch aufgrund von Nebenwirkungen assoziiert (RR 2,01 [95% CI 1,09 - 3,70]), hauptsächlich durch ein gesteigertes Risiko einer Transaminasenerhöhung (RR 2,38, [95% CI 1,06 - 5,34]). Eine Supplementierung von Folsäure oder Folinat reduzierte die Häufigkeit eines toxizitätsbedingten Therapieabbruches sowohl bei Patienten mit als auch ohne 677T-Allel.

Berkun et al. (2004) zeigten in ihrer Untersuchung an 93 RA-Patienten, dass Patienten mit dem 1298AA-Genotyp im Vergleich zu 1298CC-Patienten ein 5-fach höheres Risiko (OR 5,24, [95%CI 1,38 - 20,0]) für MTX-assoziierte Nebenwirkungen haben. Trotz der signifikant niedrigeren Nebenwirkungsrate wiesen Patienten mit dem 1298CC-Genotyp höhere Homozysteinkonzentrationen auf als 1298AA- bzw. 1298AC-Patienten. Die Wirksamkeit der MTX-Behandlung unterschied sich nicht zwischen Patienten mit oder ohne 1298C-Allel. Hinsichtlich des C677T-Polymorphismus konnte kein Zusammenhang zum Homozystein-Plasmaspiegel oder zum Auftreten von MTX-assoziierten Nebenwirkungen nachgewiesen werden. Die Verteilung des A1298C-Polymorphismus zeigte eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium. Bei Patienten mit RA fand sich eine höhere Frequenz von Homozygoten für das 1298C-Allel gegenüber gesunden Individuen (24,7% bzw. 12,8%).

In einer Studie an 106 Patienten mit RA fanden Urano et al. (2002) unterschiedliche Effekte zweier MTHFR-Genpolymorphismen hinsichtlich der Wirksamkeit und Verträglichkeit einer MTX-Therapie. So zeigte der C677T-SNP einen Zusammenhang mit der Toxizität, während der A1298C-SNP mit der Effektivität der MTX-Therapie assoziiert war. Bei 1298C-Allelträgern waren geringere MTX-Dosierungen (<5mg/Woche) notwendig, um die Krankheitsaktivität zu kontrollieren (RR 2,18, 95%CI 1,17-4,06). Außerdem wiesen diese Patienten einen stärkeren Rückgang der BSG- bzw. der CRP-Werte nach dreimonatiger MTX-Behandlung auf als Patienten mit dem 1298AA-Genotyp. Jedoch fand sich kein Unterschied in der Anzahl schmerzhafter bzw. geschwollener Gelenke. Eine Assoziation mit der Toxizität der MTX-Therapie konnte nicht nachgewiesen werden. In Bezug auf den C677T-SNP traten MTX-assoziierte Nebenwirkungen häufiger bei 677T-Allelträgern als bei Patienten mit dem 677CC-Genotyp auf (RR 1,25; 95%CI 1,05-1,49). Taniguchi et al. (2007) bestätigten dieses Ergebnis in einer weiteren Studie an 208 RA-Patienten.

Wessels et al. (2006) untersuchten die C677T- und A1298C-Genpolymorphismen bei 205 RA-Patienten. Sie fanden, dass Patienten mit dem 1298AA- bzw. 677CC-Genotyp besser auf die Behandlung mit MTX ansprachen als die Variantallelträger. Bei 1298C-Allelträgern traten Nebenwirkungen unter MTX häufiger auf als bei Patienten mit dem 1298AA-Genotyp; OR = 2,5 [95% CI 1,32 – 4,72]. Der C677T-SNP zeigte keine Assoziation zur Toxizität der MTX-Behandlung.

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen beobachteten Dervieux et al. (2006) bei RA Patienten mit dem 677TT-Genotyp gehäuft MTX-Therapieversagen. Außerdem ergab sich ein Zusammenhang zwischen dem 1298C-Allel und dem Auftreten von MTX-assoziierten Nebenwirkungen.

Im Gegensatz dazu fanden Kurzawski et al. (2007) in ihrer Untersuchung an 174 RA-Patienten eine höhere Remissionsrate bei Variantallelträgern (677T bzw. 1298C) im Vergleich zu Patienten mit dem 1298AA- bzw. 677CC-Genotyp.

Hughes et al. (2006) fanden bei Kaukasiern mit RA (n=193) einen Zusammenhang zwischen dem 1298AA-Genotyp und einem gehäuftem Auftreten von MTX-assoziierten Nebenwirkungen im Vergleich zu den Genotypen 1298AC bzw. 1298CC; OR 15,86 [95%CI 1,51 - 167,01]. Bei an RA erkrankten Schwarzsamerikanern (n=30) konnte hingegen kein Einfluss des A1298C-Polymorphismus auf die Verträglichkeit einer MTX-Therapie nachgewiesen werden. Eine Assoziation zur MTX-Wirksamkeit fand sich in beiden Populationen nicht. Der C677T-Polymorphismus war in dieser Studie weder mit der Toxizität noch mit der Wirksamkeit der MTX-Therapie assoziiert.

Auch Aggarwal et al. (2006) fanden bei 150 RA-Patienten keine Assoziation des C677T Polymorphismus zur Toxizität bzw. Wirksamkeit von MTX.

In der Studie von Kumagai et al. (2003), die an 167 RA-Patienten durchgeführt wurde, zeigte sich weder hinsichtlich des C677T- noch des A1298C-SNP eine Assoziation zur Wirksamkeit bzw. Toxizität der MTX-Behandlung.

Spelatas et al. (2005) untersuchten den C677T-Polymorphismus bei 63 Patienten mit Autoimmunerkrankungen (43/63 mit RA), die eine MTX-Behandlung mit Folsäuresupplementierung erhielten. Bei Patienten mit dem 677CC-Genotyp traten im Vergleich zu 677T-Allelträgern signifikant häufiger Nebenwirkungen auf (67% vs. 33%). Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass eine milde MTHFR-Aktivitätsverminderung infolge des 677C>T Polymorphismus bei ausreichendem Folatstatus zu einer besseren MTX-Verträglichkeit führen kann, vermutlich durch die Erhöhung der zellulären Kapazität für DNA-Synthese und -Reparatur.

Zusammenfassend führen die zwei am häufigsten beobachteten Polymorphismen des MTHFR-Gens – C677T und A1298C - zu einem Ungleichgewicht im Folsäurestoffwechsel. Hinsichtlich der Auswirkung dieser Polymorphismen auf die Wirksamkeit bzw. Toxizität einer MTX-Behandlung, deren Wirkung nach heutigem Wissensstand zum Teil durch eine Hemmung des Folatstoffwechsels vermittelt wird, liegen widersprüchliche Daten vor. In den meisten Studien ist das Vorkommen des C677T-SNP mit einem erhöhten Risiko für unerwünschte MTX-Wirkungen verbunden, eventuell vermittelt durch eine Beeinflussung des Homozysteinstoffwechsels. Diese Assoziation konnte jedoch nicht in allen Studien belegt werden. Eine Untersuchung kam zu einem gegensätzlichen Ergebnis. Die wenigen Daten über den A1298C-SNP scheinen vor allem auf eine Assoziation mit einer besseren Verträglichkeit der MTX-Therapie hinzuweisen.

1.7. Problemstellung und Zielsetzung

MTX ist die am häufigsten eingesetzte „Basistherapie“ in der Behandlung der JIA, als Monotherapie oder in Kombination mit anderen DMARDs und/oder Biologika. In jahrzehntelanger Erfahrung sowie in mehreren kontrollierten Studien erwies es sich im Allgemeinen als wirksam und relativ nebenwirkungsarm. Ein Problem stellt jedoch die breite interindividuelle Variabilität des klinischen Ansprechens und der Verträglichkeit von MTX dar. Die Erkenntnisse der mit der therapeutischen Effektivität bzw. Verträglichkeit einer MTX-Behandlung assoziierten Merkmale könnten ermöglichen Patienten mit einem erhöhten Risiko für MTX-Nebenwirkungen oder einer unzureichenden Wirksamkeit bereits bei Therapiebeginn zu identifizieren. Dies würde ermöglichen die Therapie eines individuellen Patienten zu optimieren und damit sein Outcome zu verbessern. Ferner würde eine individualisierte Therapie zur Senkung der gesamten direkten und indirekten Therapiekosten führen.

Da die Wirkung von MTX, zumindest zu einem gewissen Teil, durch die Hemmung von Folatstoffwechselenzymen bzw. durch die Folatdepletion bedingt ist, könnten die Genpolymorphismen, die die Aktivität der jeweiligen Enzyme beeinflussen, zum individuell unterschiedlichen Ansprechen auf das Medikament führen. Deshalb sind zahlreiche SNPs, die für den Folatstoffwechsel von Bedeutung sind, in den letzten Jahren zunehmend in den Blickpunkt des Interesses gerückt. Dabei wurden, wegen der wichtigen Rolle der MTHFR im Folatstoffwechsel, die zwei Polymorphismen des MTHFR-Gens – C677T und A1298C – besonders intensiv untersucht. Die vorliegenden Studiendaten belegen eine Assoziation des 677T-Allels mit dem Auftreten unerwünschter MTX-Wirkungen, vor allem mit gastrointestinalen Nebenwirkungen, einschließlich der Lebertoxizität. Für den A1298C-Polymorphismus ist die Datenlage schlechter, lässt aber eine Assoziation des 1298C-Allels mit besserer Verträglichkeit und Wirksamkeit der MTX-Therapie vermuten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die MTHFR-C677T- und -A1298C-Genpolymorphismen hinsichtlich einer möglichen Assoziation zur Wirksamkeit und zur Verträglichkeit der MTX-Behandlung bei Patienten mit JIA zu untersuchen.

2. Patienten, Materialien und Methoden

2.1. Patienten

Die Patientenrekrutierung und Datenerhebung erfolgte im Deutschen Zentrum für Kinder- und Jugendrheumatologie (DZKJR), Garmisch-Partenkirchen, im Zeitraum von 1. April 2005 bis 31. Oktober 2007.

Die Einschlusskriterien waren:

- Diagnose einer JIA anhand der ILAR-Klassifikationskriterien
- Laufende oder neu begonnene Behandlung mit MTX
- Schriftliche Einverständniserklärung der Eltern und Patienten (falls vom Alter her möglich), bei volljährigen Patienten nur die der Patienten.

Patienten mit gleichzeitig laufenden, die antirheumatische Therapie stark beeinflussenden medikamentösen Therapien, Patienten mit malignen Erkrankungen und Polymedikation, bewusstseinsgetrübte oder bewusstlose Patienten, Patienten mit chronischen schweren infektiösen Erkrankungen wie Hepatitis oder HIV, bedeutenden Herz-, Lungen- oder Stoffwechselerkrankungen, die das Ansprechen auf MTX stark beeinflussen sowie Patienten mit Drogen- oder Alkoholmissbrauch wurden von dieser Untersuchung ausgeschlossen.

Neben einer ausführlichen mündlichen Aufklärung durch den aufnehmenden Arzt oder den Studienleiter erhielten die Eltern/gesetzliche Vertreter eine schriftliche Information mit der Darstellung der Ziele und des Ablaufs der Untersuchung. Nach einer schriftlichen Zustimmung der Eltern und Patienten erfolgten die Datenerhebung und die Blutprobenentnahme für die genetische Untersuchung.

Diese Arbeit wurde im Rahmen der „GePARD“ (Genetic Polymorphisms affecting Anti-Rheumatic Drug Therapy) Studie durchgeführt. Die Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer stimmte der Durchführung der „GePARD“ Studie zu.

2.2. Studiendesign und Ablauf

Es handelte sich um eine retrospektive Beobachtungsstudie mit Genotypanalyse zur Untersuchung von Assoziationen zwischen C677T- bzw. A1298C-Genpolymorphismen der MTHFR und der Wirksamkeit bzw. Toxizität der MTX-Therapie bei Patienten mit einer JIA.

Patientenauswahl und -rekrutierung erfolgten im Deutschen Zentrum für Kinder- und Jugendrheumatologie, Garmisch-Partenkirchen.

Die Genotypanalyse wurde im Molekularbiologielabor der Rheuma-Einheit, Klinikum der Universität – Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

2.3. Datenerhebung

Folgende Daten und Parameter wurden aus den Krankenakten der jeweiligen Patienten bzw. mittels eines Fragebogens, den die Eltern ausfüllten, erhoben:

Basisdaten

- Alter bei Erkrankungsmanifestation
- Geschlecht
- Subkategorie der JIA
- Uveitis

- Immunologische Merkmale (RF, ANA und HLA B27)
- Krankheitsdauer vor MTX-Therapiebeginn
- Alter der Patienten bei MTX-Therapiebeginn
- MTX-Dosierung bei Therapiebeginn, ggf. Dosisänderungen im ersten Behandlungsjahr
- Therapiedauer, ggf. Absetzungsgrund
- Begleitmedikamente (NSAR, Steroide, andere DMARDs bzw. Biologika) während der MTX-Therapie
- Supplementierung mit Folsäure

Parameter der Erkrankungsaktivität

- Zahl der Gelenke mit aktiver Arthritis
- Zahl der Gelenke mit eingeschränktem Bewegungsumfang
- BSG- und CRP-Werte
- Vorhandensein extraartikulärer Manifestationen wie Fieber, Hautauschlag, Hepato- bzw. Splenomegalie, generalisierte Lymphadenopathie, etc.
- Vorhandensein einer aktiven Uveitis

Parameter wie CHAQ oder Globaleinschätzung der Erkrankungssituation durch den Arzt bzw. durch Eltern/Patienten konnten aufgrund des retrospektiven Studiendesigns nicht erhoben werden.

Zur Beurteilung der Effektivität der MTX-Behandlung wurden die Aktivitätsparameter bei MTX-Therapiebeginn sowie 6 und 12 Monate danach erhoben. Die Wirksamkeit der MTX-Therapie wurde nach 6 bzw. 12 Therapiemonaten folgendermaßen evaluiert:

- Kein bzw. unzureichendes Ansprechen = keine bzw. eine um <30%ige Verbesserung vom Ausgangswert hinsichtlich der Aktivitätsparameter 1-3
- Ansprechen mit einer Verbesserung um $\geq 30\%$, $\geq 50\%$ bzw. $\geq 70\%$ vom Ausgangswert der Aktivitätsparameter 1-3
- Keine Erkrankungsaktivität = alle fünf Aktivitätsparameter sind nicht vorhanden bzw. normal

Als primärer Endpunkt für die Bewertung der MTX-Wirksamkeit wurden „eine mindestens 30%ige Verbesserung der Krankheitsaktivität vom Ausgangswert nach 6 Therapiemonaten“ und „eine mindestens 70%ige Verbesserung der Krankheitsaktivität nach 12 Therapiemonaten“ gewählt.

Parameter zur MTX-Verträglichkeit

Folgende Laborwerte wurden aus Krankenakten erhoben:

- Alanin- bzw. Aspartat-Aminotransferase
- Leukozytenzahl und Differenzialblutbild
- Hämoglobin und Erythrozytenzahl
- Thrombozytenzahl
- Serum-Kreatininkonzentration
- Urinsediment und Protein im Urin

Darüber hinaus erhielten die Eltern und Patienten einen Fragebogen, in dem weitere Fragen zu Nebenwirkungen unter MTX-Therapie gestellt wurden.

Nebenwirkungen wurden als MTX-assoziiert betrachtet, wenn sie während der MTX-Therapie auftraten und eindeutig auf diese zurückzuführen waren.

Wenn möglich, wurde der Schweregrad der Nebenwirkungen anhand Common Toxicity Criteria, Version 2.0, Cancer Therapy Evaluation Program von National Cancer Institute, NIH definiert.

2.4. Probenentnahme und DNA-Isolierung

Im Rahmen einer initialen Rekrutierungsvisite wurden von den Patienten einmalig 2 ml Blut für die genetische Untersuchung abgenommen.

Die humane genomische DNA wurde von peripheren mononukleären Zellen mittels eines standardisierten Extraktionsverfahrens isoliert.

Beschreibung

Zuerst wird die DNA mit Hilfe der QIAGEN-Protease und Lysepuffer aus den Zellen des peripheren Blutes freigesetzt. Dann wird das Gemisch auf eine QIAamp-Mini-Säule gegeben und zentrifugiert. Dabei wird DNA an die Silica-Membran der QIAamp-Säule gebunden. Die Proteine und andere Kontaminanten können hingegen nicht adsorbiert werden und werden während der Waschvorgänge entfernt. Anschließend wird die DNA mittels AE-Puffer eluiert und kann bei -4°C bis zu 7 Tagen sowie bei -20°C für eine längere Dauer gelagert werden.

Reagenzien:

QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)

Zusätzlich wurden benötigt:

96 – 100% Ethanol

1,5ml-Reaktionsgefäße, DNA-frei (Biosphere Micro Tube, Sarstedt)

Pipettenspitzen mit Filter (Sarstedt)

Mikrozentrifuge (Biofuge Primo von Heraeus)

Metallblock (Thermomixer comfort von Eppendorf)

Durchführung:

Die Proben und Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht. Die Reagenzien wurden entsprechend der Bedienungsanleitung des Kits vorbereitet und der Metallblock wurde vortemperiert.

20 µl QIAGEN-Protease wurden in ein 1,5ml-Reaktionsgefäße pipettiert, 200 µl EDTA-Blut und 200 µl AL-Puffer wurden zugegeben. Das Gemisch wurde für 15 Sekunden gevortext, danach bei 56°C für 10 Minuten und bei 70 °C für weitere 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben 2 Minuten bei 8000rpm zentrifugiert, danach wurden 200 µl Ethanol (96-100%) zugegeben. Das Gemisch wurde noch einmal 15 Sekunden gevortext und erneut bei 8000rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Das Lysat wurde dann auf eine QIAamp-Mini-Säule (die sich in einer 2ml-Collection-Tube befand) gegeben und 2 Minuten bei 8000rpm zentrifugiert. Danach wurde das Filtrat zusammen mit dem Gefäße verworfen und die QIAamp-Säule wurde auf eine neue Collection-Tube gegeben. Die QIAamp-Säule wurde mit 500 µl AW1-Puffer gewaschen und anschließend bei 8000rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Die Collection-Tube wurde noch einmal gewechselt und die QIAamp-Säule wurde mit 500 µl AW2-Puffer gewaschen. Das Gemisch wurde 3 Minuten bei 11990rpm zentrifugiert. Die QIAamp-Säule wurde auf eine 1,5ml-Reaktionsgefäße gesetzt und 200 µl AE-Puffer wurde zugegeben. Das Gemisch wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 2 Minuten bei 8000rpm zentrifugiert. Die QIAamp-Säule konnte danach entfernt werden. Die in 200 µl AE-Puffer eluierte DNA befand sich jetzt in der 1,5ml-Reaktionsgefäße und wurde für weitere Untersuchung bei -20°C gelagert.

2.5. Nachweis der MTHFR C677CT- und A1298C-Polymorphismen

Die Bestimmung der MTHFR 677C>T- und 1298A>C-Polymorphismen erfolgte durch schrittweise Vervielfältigung der DNA-Fragmente mittels Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR), darauffolgenden Restriktionsverdau des PCR-Produktes mittels allelspezifischer

Restriktionsenzyme und anschließend durch Auftrennung der DNA-Fragmente mittels 3%-Agarosegelelektrophorese nach Frosst et al. (1995) und van der Put et al. (1998).

2.5.1. Selektive Amplifikation der DNA-Fragmente mittels PCR

Beschreibung

Zur Durchführung der PCR wird die eluierte DNA mit entsprechenden Vorwärts- und Rückwärts-Primern, mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) und einer Desoxynukleotidmischung gemischt. Als erster Schritt wird das Gemisch dann auf 94°C erhitzt, dabei wird die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge getrennt. Danach wird der Ansatz auf eine bestimmte Temperatur abgekühlt, sodass die Primer-Moleküle sich an die DNA-Stränge hybridisieren können. Anschließend wird die Temperatur etwas erhöht, damit aus freien Nukleotiden mittels *Taq*-Polymerase neue komplementäre DNA-Stränge synthetisiert werden können. Der Zyklus aus Denaturieren, Hybridisieren und Synthese wird insgesamt 35-mal wiederholt, dabei werden mehrere hundert Millionen Kopien des entsprechenden DNA-Abschnitts synthetisiert.

Reagenzien

- Primer (*Metabion International AG*)
 - Für MTHFR C677T:
 - Vorwärts-Primer 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' (fw = forward)
 - Rückwärts-Primer 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3' (rev = reverse)
 - Für MTHFR A1298C:
 - Vorwärts-Primer 5'-CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C-3'
 - Rückwärts-Primer 5'-CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG-3'
- PCR-Master Kit (PeqLab)

PCR-Ansatz für eine Probe

Reagenzien	MTHFR 677C>T	MTHFR 1298A>C
0,2µg DNA aus QIAgenisolierung	5µl (0,04µg/µl)	5µl (0,04µg/µl)
MTHFR 677 Vorwärts-Primer	0,05µl (100pmol/µl)	-
MTHFR 677 Rückwärts-Primer	0,05µl (100pmol/µl)	-
MTHFR 1298 Vorwärts-Primer	-	0,05µl (100pmol/µl)
MTHFR 1298 Rückwärts-Primer	-	0,05µl (100pmol/µl)
PCR-Master	12,5µl	12,5µl
Aqua dest. (vom Kit)	7,4µl	7,4µl
Gesamtvolumen	25µl	25µl

Thermocycler PCR-Program

1. 94⁰C 12 min.
2. 94⁰C 30 sec.
3. 60⁰C 30 sec.
4. 72⁰C 30 sec.
5. 72⁰C 3 min.
6. 4⁰C Pause

Die Schritte 2 – 4 der PCR wurden 35-mal wiederholt. Damit ergab sich ein Gesamtlauf der PCR von ca. 1h 26 min.

Ergebnis

Wenn die 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' Vorwärts- und 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3' Rückwärts-Primer (spezifisch für den MTHFR-C677T-Polymorphismus) angesetzt wurden, wurde ein DNA-Abschnitt mit 198 bp amplifiziert. Wenn die 5'-CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C-3' Vorwärts- und 5'-CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG-3' Rückwärts-Primer (spezifisch für den MTHFR-A1298C-Polymorphismus) angesetzt wurden, wurde ein DNA-Abschnitt von 163 bp amplifiziert.

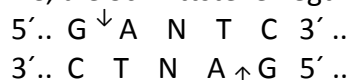
2.5.2. Restriktionsverdau des PCR-Produktes mittels allelspezifischer Restriktionsenzyme

Beschreibung

Das PCR-Produkt wird durch Restriktionsverdau mit allelspezifischen Restriktionsenzymen (*HinfI* für MTHFR C677T- bzw. *MboII* für MTHFR A1298C-Polymorphismus) in die entsprechenden Fragmente gespalten. Dabei erkennt jedes Restriktionsenzym eine spezifische DNA-Sequenz, die Schnittstelle liegt in der Regel innerhalb oder in der Nähe der Erkennungssequenz. Durch Nukleotidaustausch an einer bestimmten Position der DNA-Sequenz kann eine Erkennungssequenz für ein bestimmtes Restriktionsenzym entstehen oder, umgekehrt, verloren gehen. Dementsprechend wird das Produkt des Restriktionsverdaus DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge enthalten, abhängig davon, ob die DNA geschnitten wird oder nicht.

Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym *HinfI* wird zur Bestimmung des MTHFR-C677T-Genotyps verwendet. Die Erkennungssequenz ist G[↓]ANTC, die Schnittstelle liegt zwischen G und A:



Restriktionsenzym *MboII* wird zur Bestimmung des MTHFR-A1298C-Genotyps eingesetzt. Die Erkennungssequenz ist GAAGA, die Schnittstelle liegt nach dem 8./7. Nukleotid nach der Erkennungssequenz:



Reagenzien

- Restriktionsenzyme (New England BioLabs Inc.)
 - Für MTHFR C677T: Restriktionsenzym *HinfI*
 - Für MTHFR A1298C: Restriktionsenzym *MboII*
- NEBuffer 2 (bei New England BioLabs Inc.)

Restriktionsverdau - Ansatz für eine Probe

Reagenzien	MTHFR 677C>T	MTHFR 1298A>C
PCR-Produkt	8µl	8µl
NEBuffer	1µl	1µl
Restriktionsenzym Hinf I	1µl	-
Restriktionsenzym Mbo II	-	1µl
Gesamtvolumen	10µl	10µl

Das Gemisch wurde dann im Thermocycler bei 37° C über Nacht inkubiert.

Ergebnis

C677T. Durch den Austausch C→T an der Position 677 des MTHFR-Gens entsteht eine *HinfI*-spezifische Erkennungssequenz. Das Restriktionsenzym *HinfI* spaltet den 677T-enthaltenden DNA-Abschnitt in zwei Fragmente mit 175 bp und 23 bp. Das 677C-spezifische Fragment enthält keine *HinfI*-Schnittstelle und wird nicht gespalten. Somit resultiert der Restriktionsverdau mit *HinfI* beim 677TT-Genotyp in DNA-Fragmenten mit 175 bp und 23 bp, beim 677CT-Genotyp in Fragmenten mit 198 bp, 175 bp und 23 bp, beim 677CC-Genotyp in Fragmenten mit 198 bp.

A1298C. Der Austausch A→C an der Position 1298 des MTHFR-Gens resultiert in der Elimination der *MboII*-spezifischen Erkennungssequenz in diesem Bereich. Das Enzym *MboII* spaltet den 1298A-enthaltenden DNA-Abschnitt in 5 Fragmente mit 56 bp, 31 bp, 30 bp, 28 bp und 18 bp, sowie den 1298C-enthaltenden DNA-Abschnitt in 4 Fragmente mit 84 bp, 31 bp, 30 bp und 18 bp. Somit entstehen nach der Restriktionsverdau mit *MboII* beim 1298AA-Genotyp die DNA-Fragmente mit 56 bp, 31 bp, 30 bp, 28 bp und 18 bp, beim 1298AC-Genotyp die Fragmente mit 84 bp, 56, 31 bp, 30 bp, 28 bp und 18 bp, beim 1298CC-Genotyp die Fragmente mit 84 bp, 31 bp, 30 bp und 18 bp.

2.5.3. Auftrennung der DNA-Fragmente mittels 3%-Agarosegelelektrophorese

Beschreibung

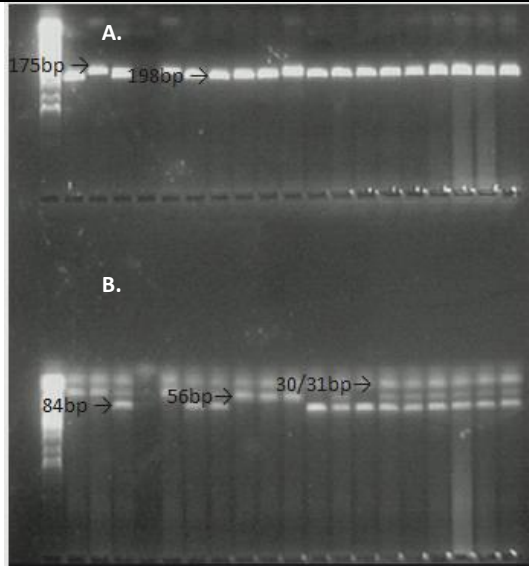
Die Agaroselösung wird mit einem fluoreszierten Farbstoff gemischt und in einer speziellen Gelkammer abgekühlt. Danach werden die DNA-Proben in die Geltaschen pipettiert, dabei wird der Farbstoff an die DNA-Moleküle gebunden. Während der Elektrophorese bewegen sich die kleineren DNA-Fragmente schneller als die längeren, somit entsteht eine Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe. Das Gel wird dann im ultravioletten (UV) Licht analysiert. Der Farbstoff fluoresziert im UV-Licht und macht die DNA-Banden sichtbar. Die Größe der Banden wird durch einen Vergleich mit einer DNA-Leiter, die DNA-Banden bekannter Länge enthält und parallel zur Probe im Gel mitläuft, bestimmt.

Durchführung

In einer Erlenmeyerkolbe wurden 3g Agarose und 100ml TAE-Puffer (1:50 verdünnt mit Aqua dest.) gemischt und in der Mikrowelle aufgekocht bis die Agarose völlig gelöst war. Für die Färbung wurden 20µl Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland Inc USA) zugegeben. 100ml dieser Lösung wurden in eine Gelkammer gegeben und abgewartet, bis das Gel fest wurde. Danach wurde das Gel in Laufpuffer gelegt. 5µl der DNA-Leiter (AppliChem) wurden als Größenmarker in die erste Tasche des Gels gespritzt. 1µl Ladepuffer (AppliChem) wurde zu den 10µl des Restriktionsverdauprodukts zugegeben und die Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde unter einer Spannung von 120 V (500 mA; 150 Watt) über 80 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mittels UV-Licht analysiert.

Nach der Elektrophorese konnte der 677CC-Genotyp als eine Bande entsprechend dem Molekulargewichtsmarker von 198bp erkannt werden. Der 677CT-Genotyp wurde als 2 Banden von 198bp und 175bp gesehen. Der 677TT-Genotyp wurde als eine 175bp-Bande erkannt. Bezüglich des A1298C-Polymorphismus resultierte der 1298AA-Genotyp in 2 Banden von 56bp und 31/30/28bp, der 1298AC-Genotyp in 3 Banden von 84bp, 56bp und 31/30/28bp bzw. der 1298CC-Genotyp in 2 Banden von 84bp und 31/30bp.

Abb. 1: Auftrennung der DNA-Fragmente auf dem 3%-Agarosegel mittels Elektrophorese



A. MTHFR 677C>T.

Das PCR-Produkt ist ein DNA-Fragment von 198-bp-Molekulargewicht. Nach der Restriktionsverdau mittels *HinfI* und Gelelektrophorese sind folgende Banden zu erkennen:
677CC-Genotyp = 1 Bande von 198-bp
677CT-Genotyp = 2 Banden von 198-bp und 175-bp (das 23bp-Band ist häufig schwer erkennbar)
677TT-Genotyp = 1 Bande von 175-bp.

B. MTHFR 1298A>C.

Das PCR-Produkt ist ein DNA-Fragment von 163bp-Molekulargewicht. Nach dem Restriktionsverdau mittels *MboII* und der Gelelektrophorese sind folgende Banden zu erkennen:
1298AA-Genotyp = 2 Banden von 56-bp und 31/30/28bp (das 18bp-Band ist schwer erkennbar)
1298AC-Genotyp = 3 Banden von 84bp, 56bp und 31/30/28bp.
1298CC-Genotyp = 2 Banden von 84bp und 31/30bp.

2.6. Datenschutz

Alle erhobenen Daten und Befunde wurden nach den Richtlinien des Datenschutzes mit getrennten Personendaten- und Parameterdateien verarbeitet. Bei Digitalisierung der Daten für die Studienauswertung wurden die Namen, Adressen, Geburtsdaten und Identifikationsnummern in einer getrennten Datei auf einem mobilen Datenträger (ZIP) im MS-Excel-Format abgelegt und nur zur notwendigen Kommunikation mit den Patienten verwendet. Nach vollständiger Datenerfassung und Gewinnung des genetischen Materials wurden die Identifikationsparameter vom Rechner gelöscht und die gewonnenen Daten irreversibel anonymisiert. Analysiert wurden nur die anonymisierten Daten. Nach Abschluss der Untersuchungen wurde die DNA nicht vernichtet, sondern in einer Biobank bis zum Ende der Haltbarkeit gelagert, damit sie ggf. für ergänzende Untersuchungen zur Verfügung stehen kann. Allerdings sind die Daten vollständig anonymisiert. Es wird keine Obergrenze der Lagerungsdauer angegeben, wir beziehen uns auf die Empfehlungen des Nationalen Ethikrates vom April 2004 für Biobanken. Danach ist die Angabe einer oberen Lagerungsgrenze für anonymisierte DNA als nicht sinnvoll und zweckdienlich für den Schutz des Patienten erachtet worden.

2.7. Statistische Datenanalyse

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Software SPSS 15.0 für Windows (SPSS Inc.).

Zur zusammenfassenden Darstellung der intervallskalierten (metrischen) Daten wurden Lage- und Streumaße, wie Mittelwert, Standardabweichung (SD), Median, Perzentilwerte und Spannweite berechnet. Zur graphischen Darstellung der Verteilung wurden Boxplots verwendet. Der Boxplot besteht aus einer Box, die vom ersten und dritten Quartil (25. und 75. Perzentil) begrenzt wird. Die innere horizontale Linie repräsentiert den Median, die obere bzw. untere Linie (Whiskers) markiert den größten bzw. kleinsten Wert, der noch kein Ausreißer ist. Die Werte, die um mehr als anderthalb Boxlängen außerhalb der Box liegen (Ausreißer), werden durch einen Kreis gekennzeichnet. Die Werte, die um mehr als drei Boxlängen außerhalb der Box liegen (Extremwerte), werden durch ein Sternchen markiert. Für kategoriale Variablen wurden absolute und relative Häufigkeiten (Anzahl der Patienten bzw. Prozentzahl) berechnet. Zur graphischen Darstellung wurden Balkendiagramme verwendet.

Zur Überprüfung, ob sich Gruppen hinsichtlich bestimmter Merkmale signifikant unterscheiden, wurden diverse statistische Tests durchgeführt. Mittels der Teststatistik wurde die Wahrscheinlichkeit (p) berechnet, mit der die Nullhypothese (Negativhypothese) fälschlicherweise abgelehnt wird. Die Nullhypothese wurde bei einem p -Wert von $\leq 0,05$ verworfen, das Signifikanzniveau lag somit bei 5%.

Metrische normalverteilte Daten wurden bei zwei Stichproben mit dem T-Test nach Student analysiert, bei drei und mehr unabhängigen Stichproben wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Post-Hoc-Mehrfachvergleich-Tests durchgeführt. Metrische nicht-normalverteilte Daten wurden mit nicht-parametrischen Tests analysiert (Mann-Whitney-Test bei zwei bzw. Kruskal-Wallis-Test bei drei und mehr unabhängigen Stichproben). Zur Prüfung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewendet.

Bei der Analyse kategorialer Variablen wurden Kreuztabellen erstellt und der Chi-Quadrat-Test (χ^2) bzw. der „exakter Test nach Fisher“ durchgeführt.

Anschließend wurde eine logistische Regressionsanalyse der untersuchten Variablen durchgeführt, um ein prädiktives Modell zu konstruieren, mit dem das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein der dichotomalen Bewertungsvariablen vorhergesagt werden konnte, und um die Quotenverhältnisse jeder unabhängigen Einflussvariablen im Modell zu schätzen.

3. Ergebnisse

3.1. Eigenschaften und Verteilung des Patientenkollektivs

Geschlechtsverteilung

Insgesamt konnten 277 Patienten rekrutiert werden, von denen 102 männlich und 175 weiblich waren (m:w = 1:1,6).

Diagnoseverteilung

An JIA-Kategorien waren Oligoarthritis (47%) und RF-negative Polyarthritits (20%) sowohl bei Mädchen als auch bei Jungen am häufigsten diagnostiziert. Außerdem kamen die Psoriasisarthritis und RF-positive Polyarthritits häufiger bei Mädchen (jeweils 6,9%), sowie systemische JIA und Enthesitis-assoziierte Arthritis bei Jungen (11,8% bzw. 17,6%) vor. *Tabelle 3* und *Abbildung 2* zeigen die Häufigkeitsverteilung der JIA-Subkategorien im Patientenkollektiv.

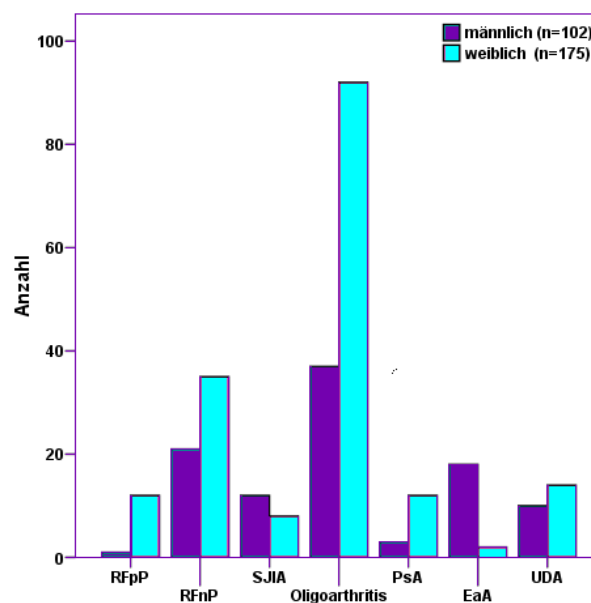
Tabelle 3: Häufigkeitsverteilung der JIA-Kategorien (n=277)

Kategorie der JIA	männlich (n=102)		weiblich (n=175)		p [#]	Gesamt (n=277)	
	Anzahl	%*	Anzahl	%*		Anzahl	%
RFpP	1	1,0	12	6,9	0,036	13	4,7
RFnP	21	20,6	35	20,0	1,00	56	20,2
SJIA	12	11,8	8	4,6	0,031	20	7,2
Oligoarthritis	37	36,3	92	52,6	0,009	129	46,6
<i>persistierende</i>	21	20,6	45	25,7	0,38	66	23,8
<i>erweiterte</i>	16	15,7	47	26,9	0,037	63	22,7
PsA	3	2,9	12	6,9	0,27	15	5,4
EaA	18	17,6	2	1,1	<0,001	20	7,2
UDA	10	9,8	14	8,0	0,66	24	8,7

RF = Rheumafaktor, RFpP = RF-positive Polyarthritits, RFnP = RF-negative Polyarthritits, SJIA = systemische JIA, PsA = Psoriasisarthritis, EaA = Enthesitis-assoziierte Arthritis, UDA = undifferenzierte Arthritis.

*Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtanzahl der Patienten in der jeweiligen Geschlechtsgruppe. [#]Exakter Test nach Fisher.

Abb. 2: Häufigkeitsverteilung der JIA-Kategorien (n=277)



RF = Rheumafaktor, RFpP = RF-positive Polyarthritits, RFnP = RF-negative Polyarthritits, SJIA = systemische JIA, PsA = Psoriasisarthritis, EaA = Enthesitis-assoziierte Arthritis, UDA = undifferenzierte Arthritis.

Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 6,5 Jahren (SD: 4,2 Jahre; Minimum-Maximum: 1,0-16,0 Jahre).

Eine JIA-assoziierte chronische anteriore Uveitis wurde bei 43 Patienten (15,2%) diagnostiziert (34/43 hatten Oligoarthritis; 41/43 waren ANA-positiv; 30/43 waren Mädchen). Lediglich bei einem Patienten (männlich, HLA-B27-positiv, ANA-negativ) mit Enthesitis-assoziiierter Arthritis kam es im Krankheitsverlauf zu einer akuten anterioren Uveitis.

Insgesamt 17 Patienten (6,1%) hatten RF, 49 Patienten (17,7%) waren HLA-B27-Träger, bei 176 Patienten (63,5%) wurden ANA nachgewiesen.

MTX-Therapie

Die Behandlung mit MTX wurde im Alter von $8,6 \pm 4,4$ Jahren (Mittelwert \pm SD) begonnen, im Mittel $2,2 \pm 2,7$ Jahre (Minimum – Maximum: 0,0 – 17,0 Jahre) nach dem Erkrankungsbeginn, mit einer Dosierung von $12,7 \pm 2,4$ mg/m²*KOF/Woche (26 Patienten erhielten das MTX in einer Dosis von <10 mg/m²*KOF/Woche wegen Unverträglichkeit höherer Dosierungen). Bei 119 Patienten (43%) wurde die MTX-Therapie innerhalb der ersten 6 Monate nach der Krankheitsmanifestation begonnen, bei 51 Patienten (18%) gab es eine Zeitdifferenz von 6 bis 12 Monaten, bei 107 Patienten (39%) wurde das MTX erst nach dem ersten Erkrankungsjahr eingesetzt. Bei 261 Patienten war das MTX das erste DMARD, 13 Patienten wurden aufgrund unzureichender Wirksamkeit anderer DMARDs auf MTX umgestellt (Hydroxy-/Chloroquin – 6, Azathioprin – 4, Cyclosporin-A – 2, Sulfasalazin – 1). Bei 260 Patienten wurde MTX initial als Monotherapie verabreicht, 13 Patienten erhielten es in Kombination mit anderen DMARDs, 3 Patienten bekamen eine Kombinationstherapie mit MTX und Etanercept. Die mittlere MTX-Behandlungsdauer betrug $35,8 \pm 25,0$ Monate (25.-75. Perzentile: 17,0 – 51,0 Monate). 117 Patienten beendeten die MTX-Therapie zum Zeitpunkt der Rekrutierung, von diesen 40 Patienten aufgrund einer Remission, 17 aufgrund unzureichender Wirksamkeit, und 57 aufgrund MTX-assoziiierter Nebenwirkungen.

Tabelle 4: Allgemeine Daten zu MTX-Behandlung

	Mittelwert \pm SD	Median	IQR*
Alter bei MTX-Therapiebeginn (Jahre)	8,6 \pm 4,4	8,0	5,0 – 12,0
Krankheitsdauer vor MTX-Therapiebeginn (Jahre)	2,1 \pm 2,7	1,0	0,3 – 3,0
MTX-Dosierung (mg/m²*KOF/Woche)[§]	12,7 \pm 2,4	12,9	11,2 – 14,0
MTX-Therapiedauer (Monate)	35,8 \pm 25,0	29,0	17,0 – 51,0

*IQR = interquartile range (25. – 75. Perzentile).

[§]26 Patienten erhielten das MTX in einer Dosis von <10 mg/m²KOF/Woche wegen der Unverträglichkeit höherer Dosierungen.

Begleittherapien

Folsäure: 77 Patienten (28%) erhielten eine prophylaktische Supplementierung mit Folsäure 5-10mg/Woche ab dem MTX-Behandlungsbeginn, bei weiteren 113 Patienten (41%) wurde die Folsäure in einer Dosierung von 5-30mg/Woche aufgrund MTX-assoziiierter Nebenwirkungen im Therapieverlauf eingesetzt. 75 Patienten (27%) bekamen keine Folsäuresupplementierung während der gesamten Behandlungsdauer mit MTX.

DMARDs: 260 Patienten (94%) begannen das MTX als Monotherapie, 16 Patienten (5,8%) in Kombination mit anderen DMARDs (Hydroxy-/Chloroquin – 6, Azathioprin – 4, Etanercept – 3, Cyclosporin-A – 2, Sulfasalazin – 1). Im Therapieverlauf wurde bei 58 Patienten aufgrund unzureichender Wirksamkeit mindestens ein weiteres DMARD zu MTX-Behandlung hinzugefügt, von diesen bei 36 Patienten bereits im ersten MTX-Behandlungsjahr.

202 von 277 Patienten (73%) erhielten das MTX als Monotherapie während der gesamten Behandlungsdauer.

Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR): 256 von 277 Patienten (92,4%) erhielten gleichzeitig ein NSAR. Bei 4 Patienten wurde kein NSAR verabreicht. Für 17 Patienten lagen keine Angaben vor.

Steroide: 52/277 Patienten (19%) wurden zusätzlich mit oralen Steroiden behandelt, davon 36 in einer Dosis von <0,5mg Prednisolonäquivalent/kg*Körpergewicht(KG)/Tag, 9 Patienten in einer Dosierung von 0,5–1,0 mg/kg*KG/Tag bzw. 5 Patienten in einer Dosierung von >1mg/kg*KG/Tag. Bei 2 Patienten war die Steroiddosis unbekannt. 40 Patienten erhielten zusätzlich eine Puls-Therapie mit Methylprednisolon intravenös. 149 von 277 Patienten (53,8%) bekamen insgesamt 447 intraartikuläre Steroidinjektionen während der gesamten MTX-Behandlungsdauer.

3.1.1. MTHFR-Genpolymorphismus C677T und A1298C

MTHFR Genpolymorphismus C677T

Der C677T-Polymorphismus wurde bei 275 Patienten bestimmt. Bei 2 Patienten war der Restriktionsverdau erfolglos.

123 Patienten hatten den 677CC-Genotyp (Wildtyp), 117 Patienten hatten den 677CT-Genotyp und 35 Patienten waren homozygot für das 677T-Allel (*Tabelle 5*). Die Häufigkeit des 677T-Allels betrug damit 0,34. Die Verteilung der C677T-Genotypen zeigte keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (χ^2 -Test, $p>0,05$). Darüber hinaus wurden die Genotyp- bzw. Allelhäufigkeiten im Patientenkollektiv mit der bei gesunden Individuen aus zwei bereits veröffentlichten Untersuchungen aus Deutschland verglichen. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Allel- bzw. Genotypfrequenz zwischen JIA-Patienten und gesunden Kontrollen (*Tabelle 5*).

Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung der MTHFR C677T-Genotypen bzw. des 677T-Allels (Anzahl (%))

	CC	CT	TT	Insgesamt	T-Allelfrequenz
Studienpatienten*	123 (44,7)	117 (42,5)	35 (12,6)	275 (100)	0,34
Gesunde Individuen¹	113 (53,0)	73 (34,3)	27 (12,7)	213 (100)	0,30
Gesunde Individuen²	443 (45,1)	442 (45,1)	96 (9,8)	981 (100)	0,31

*Patienten mit einer JIA. Die Genotypverteilung zeigte keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (χ^2 -Test, $p>0,05$).

¹Richter et al. (2001). Die Genotypverteilung zeigte eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (χ^2 -Test, $p<0,05$). Die Häufigkeit der einzelnen C677T-Genotypen bzw. des 677T-Allels zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Studienpatienten mit JIA und den gesunden Kontrollen (χ^2 -Test, $p>0,05$).

²Meisel et al. (2001). Die Verteilung der C677T-Genotypen zeigte keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (χ^2 -Test, $p>0,05$). Die Häufigkeit der einzelnen C677T-Genotypen bzw. des 677T-Allels zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Studienpatienten mit JIA und den gesunden Kontrollen (χ^2 -Test, $p>0,05$).

MTHFR Genpolymorphismus A1298C

Der A1298C-Polymorphismus wurde bei 276 Patienten bestimmt. Bei einem der Patienten ergab der Restriktionsverdau kein Ergebnis.

142 Patienten hatten den Genotyp 1298AA, 92 Patienten hatten den 1298AC-Genotyp und 42 Patienten waren homozygot für das 1298C-Allel (*Tabelle 6*). Die 1298C-Allelfrequenz lag bei 0,32. Die Genotypverteilung zeigte dabei eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (χ^2 -Test, $p<0,01$). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Allel- bzw. Genotypfrequenz zwischen den JIA-Patienten und gesunden Kontrollen aus der Studie von Richter et al. (2001), jedoch war die Häufigkeit des heterozygoten Genotyps 1298AC in der Studienpopulation signifikant niedriger im Vergleich mit den Daten für gesunden Individuen aus der Studie von Meisel et al. (2001) (*Tabelle 6*).

Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung der MTHFR A1298C-Genotypen bzw. des 1298C-Allels (Anzahl (%))

	AA	AC	CC	Gesamt	C-Allelfrequenz
Studienpatienten*	142 (51,4)	92 (33,3) [§]	42 (15,2)	276 (100)	0,32
Gesunde Individuen¹	103 (48,4)	85 (39,9)	25 (11,7)	213 (100)	0,32
Gesunde Individuen²	433 (44,1)	443 (45,2) [§]	105 (10,7)	981 (100)	0,33

*Patienten mit JIA. Die Genotypverteilung zeigte eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (Chi²-Test, p<0,05).

¹Richter et al. (2001). Die Genotypverteilung zeigte keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (Chi²-Test, p>0,05). Die Häufigkeit der A1298C-Genotypen bzw. des 1298C-Allels zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Studienpatienten mit JIA und den gesunden Kontrollen (Chi²-Test, p>0,05).

²Meisel et al. (2001). Die Verteilung der A1298C-Genotypen zeigte keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (Chi²-Test, p>0,05). [§]Der Unterschied zwischen den Studienpatienten und gesunden Individuen war statistisch signifikant (Chi²-Test, p<0,05).

MTHFR C677T und A1298C Genotypkombinationen

Die Kombinationen zweier MTHFR-Genpolymorphismen wurden bei 275 Patienten untersucht. *Tabelle 7* zeigt die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Genotypkombinationen. Die Genotypkombinationen 677CT-1298CC, 677TT-1298AC und 677TT-1298CC sind nicht aufgetreten. 50 Patienten (18%) hatten den kombiniert heterozygoten Genotyp 677CT-1298AC.

Tabelle 7: Häufigkeitsverteilung der MTHFR A1298C-C677T Genotypkombinationen (Anzahl (%))

A1298C-Genotyp	C677T-Genotyp		
	677CC	677CT	677TT
1298AA	39 (14,2)	67 (24,4)	35 (12,7)
1298AC	42 (15,3)	50 (18,2)	0
1298CC	42 (15,3)	0	0

Eigenschaften der Patientensubgruppen mit einzelnen C677T- bzw. A1298C-Genotypen

Die Verteilung der Baseline-Parameter wie Geschlecht und Alter der Patienten, Kategorie der JIA, Krankheitsdauer vor MTX-Behandlungsbeginn, initiale Dosierung von MTX, die Häufigkeit der Kombinationstherapien mit DMARDs, Steroiden und NSAR sowie die der Folsupplementierung zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede sowohl zwischen den Patienten mit 677CC-, 677CT- und 677TT-Genotypen, als auch zwischen den Patienten mit 1298AA-, 1298AC- und 1298CC-Genotypen (*Tabelle 8, 9*).

Tabelle 8: Diagnoseverteilung zwischen einzelnen C677T- bzw. A1298C-Genotypen

JIA-Kategorie	C677T-Genotyp ¹			A1298C-Genotyp ²		
	CC (n=123)	CT (n=117)	TT (n=35)	AA (n=142)	AC (n=92)	CC (n=42)
RFpP	8	5	0	7	2	4
RFnP	24	25	7	31	19	6
SJIA	8	9	3	10	5	5
Oligoarthritis	56	57	16	67	45	17
<i>persistierende</i>	28	32	6	31	25	10
<i>erweiterte</i>	28	25	10	36	20	7
PsA	6	7	1	7	6	2
EaA	11	6	3	10	8	2
UDA	10	8	5	10	7	6

RF = Rheumafaktor, RFpP = RF-positive Polyarthritis, RFnP = RF-negative Polyarthritis, SJIA = systemische JIA, PsA = Psoriasisarthritis, EaA = Enthesitis-assoziierte Arthritis, UDA = undifferenzierte Arthritis.

^{1,2} Chi²-Test, p >> 0,05.

Tabelle 9: Eigenschaften der Patientensubgruppen mit einzelnen C677T- bzw. A1298C-Genotypen

	C677T-Genotyp				A1298C-Genotyp			
	CC (n=123)	CT (n=117)	TT (n=35)	p [#]	AA (n=142)	AC (n=92)	CC (n=42)	p [#]
Geschlecht:								
männlich	49	39	14	0,54 ¹	50	36	16	0,82 ¹
weiblich	74	78	21		92	56	26	
Alter bei Krankheitsmanifestation (Jahre)	6,9 ± 4,4 (6,0)	6,1 ± 4,1 (5,0)	6,9 ± 3,6 (7,0)	0,29 ²	6,4 ± 3,8 (6,0)	6,5 ± 4,5 (5,0)	7,0 ± 4,7 (6,0)	0,74 ²
Alter bei MTX-Therapiebeginn (Jahre)	8,8 ± 4,4 (9,0)	8,2 ± 4,4 (8,0)	9,1 ± 4,2 (8,0)	0,38 ³	8,4 ± 4,0 (8,0)	8,8 ± 4,8 (9,0)	8,8 ± 4,6 (8,5)	0,84 ³
Erkrankungsdauer vor MTX-Therapiebeginn (Jahre)	2,0 ± 2,4 (1,0)	2,2 ± 2,8 (1,0)	2,3 ± 3,5 (1,0)	0,96 ³	2,1 ± 2,5 (1,0)	2,3 ± 3,1 (1,0)	1,9 ± 2,3 (1,0)	0,56 ³
MTX-Dosis (mg/m ² *KOF/Woche) [§]	12,7 ± 2,4 (12,9)	12,6 ± 2,5 (12,5)	13,2 ± 2,2 (13,0)	0,41 ²	12,6 ± 2,4 (12,7)	12,7 ± 2,5 (13,0)	12,9 ± 1,9 (13,0)	0,69 ²
Kombinationstherapien:								
DMARD(s)/Biologika	22	26	10	0,36 ¹	31	18	9	0,93 ¹
Steroide oral	25	18	9	0,34 ¹	23	20	9	0,51 ¹
NSAR ^{&}	117	105	32	0,75 ¹	127	87	41	0,63 ¹
Folatsupplementierung initial*	39	31	7	0,45 ¹	36	30	11	0,51 ¹

[§]n=267. [&]n=260. *Prophylaktische Supplementierung mit Folsäure ab MTX-Therapiebeginn.

Angaben für quantitative Variablen: Mittelwert ± SD (Median). Angaben für kategoriale Variablen: absolute Häufigkeiten.

[#]p-Werte > 0,05 = statistisch nicht signifikant. ¹Chi²-Test bzw. exakter Test nach Fisher. ²ANOVA. ³Kruskal-Wallis-Test.

3.2. Bewertung der Wirksamkeit der MTX-Therapie

Zur Beurteilung der MTX-Therapieeffektivität wurde die Krankheitsaktivität bei MTX-Therapiebeginn sowie 6 und 12 Monate danach evaluiert und die Verbesserung der Krankheitsaktivität unter MTX-Therapie wurde in Prozent vom Ausgangswert berechnet.

Während der gesamten Bewertungsphase war MTX als Monotherapie zu verabreichen. Kombinationstherapien mit anderen DMARDs und/oder Biologika sowie mit Steroiden in einer Tagesdosis über 0,5 mg Prednisolonäquivalent/kg*KG bzw. eine Puls-Therapie mit Methylprednisolon während des Bewertungszeitraums galten als Ausschlusskriterium. Begleittherapien wie NSAR und Steroide in einer Dosis von $\leq 0,5$ mg/kg*KG/Tag (maximal 10mg/Tag) oral wurden erlaubt.

3.2.1. Krankheitsaktivität bei MTX-Therapiebeginn

267 Patienten hatten eine aktive Arthritis bei MTX-Therapiebeginn. 119 von denen hatten eine Arthritis ≤ 4 Gelenke (27 Patienten mit Monoarthritis), 121 Patienten hatten eine Polyarthritis. Mittlere BSG-Werte lagen vor MTX-Therapiebeginn bei $41,9 \pm 31,8$ mm/h (Median: 33,5; IQR: 15,0 - 62,3), mittlere CRP-Werte bei $2,9 \pm 4,7$ mg/dl (Median: 1,2; IQR: 0,02 - 3,4).

Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Labor- und Gelenkparameter bei MTX-Therapiebeginn zwischen den Patienten mit einzelnen C677T- bzw. A1298C-Genotypen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Krankheitsaktivität bei MTX-Therapiebeginn unter Patienten mit einzelnen C677T- bzw. A1298C-Genotypen

	C677T-Genotyp				A1298C-Genotyp			
	CC (n=123)	CT (n=117)	TT (n=35)	p [#]	AA (n=142)	AC (n=92)	CC (n=42)	p [#]
Gelenke mit Arthritis (n=246)	8,1 \pm 9,4 (4,0)	7,9 \pm 8,1 (5,0)	8,8 \pm 10,3 (4,0)	0,94 ²	7,9 \pm 8,7 (4,0)	8,2 \pm 8,6 (5,0)	8,7 \pm 10,4 (4,0)	0,7 ²
Polyarthritis	52	56	12	0,49 ¹	59	47	15	0,43 ¹
Oligoarthritis	55	47	16		62	37	19	
Eingeschränkte Gelenke (n=246)	8,0 \pm 10,1 (5,0)	7,6 \pm 7,6 (5,0)	7,9 \pm 9,7 (3,5)	0,71 ²	7,9 \pm 7,8 (5,0)	7,2 \pm 7,7 (5,0)	8,7 \pm 14,1 (3,0)	0,37 ²
BSG (mm/h) (n=235)	43,7 \pm 32,2 (39,0)	40,6 \pm 30,7 (32,0)	41,6 \pm 35,6 (30,0)	0,80 ²	44,2 \pm 31,6 (40,0)	39,8 \pm 33,8 (30,0)	39,4 \pm 28,2 (38,0)	0,44 ²
CRP (mg/dl) (n=229)	3,4 \pm 5,1 (1,3)	2,6 \pm 4,7 (1,0)	2,5 \pm 3,3 (1,1)	0,28 ²	2,8 \pm 4,1 (1,2)	2,6 \pm 4,7 (1,0)	4,0 \pm 6,8 (1,2)	0,52 ²

Angaben für quantitative Variablen: Mittelwert \pm SD (Median). Angaben für kategoriale Variablen: absolute Häufigkeiten.

[#]p-Werte > 0,05 = statistisch nicht signifikant. ¹Chi²-Test bzw. exakter Test nach Fisher. ²Kruskal-Wallis-Test.

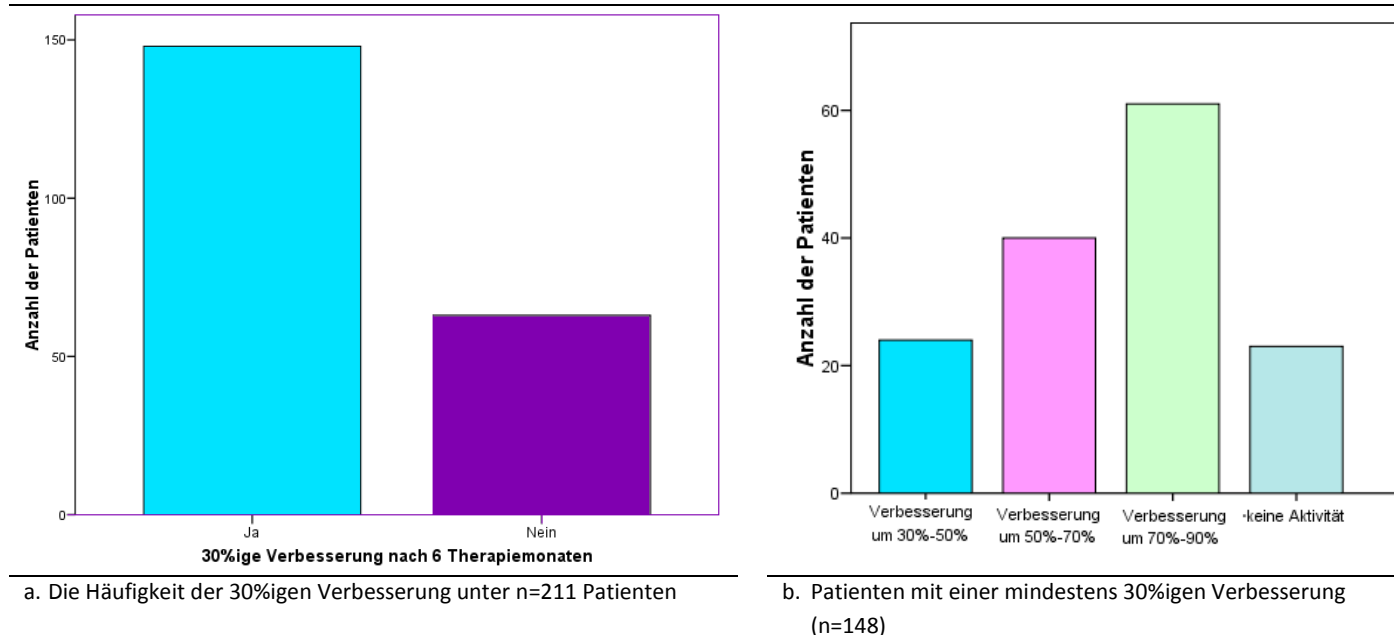
3.2.2. Ansprechen auf MTX nach 6 Therapiemonaten

211 Patienten wurden in die Analyse eingeschlossen. Als primärer Endpunkt für die Bewertung der MTX-Wirksamkeit wurde eine „mindestens 30%ige Verbesserung vom Ausgangswert in allen Aktivitätsparametern nach 6 Therapiemonaten“ gewählt.

148 von 211 Patienten (70,1%) erreichten eine Verbesserung der Krankheitsaktivität um mindestens 30% vom Ausgangswert, dabei zeigten 124 Patienten eine Verbesserung um $\geq 50\%$, 84 Patienten um $\geq 70\%$, bei 23 Patienten war die Erkrankung zu diesem Zeitpunkt bereits inaktiv (Abbildung 3). 63

Patienten (29,9%) zeigten praktisch keine Verbesserung der Krankheitsaktivität nach 6 Monaten unter MTX-Therapie.

Abb. 3: Ansprechen auf MTX nach 6 Therapiemonaten



Das Geschlecht und Alter der Patienten sowie die Kategorie der JIA und die Erkrankungsdauer vor MTX-Therapiebeginn zeigten keinen Zusammenhang mit dem Therapieansprechen nach 6 Monaten (*Tabelle 13*).

Eine statistisch signifikante Assoziation zur MTX-Wirksamkeit ergab sich für die MTX-Dosierung sowie für die Anzahl der arthritischen Gelenke bei Therapiebeginn (*Tabelle 13*).

Patienten, die MTX in einer Dosis von $\geq 10 \text{ mg/m}^2 \cdot \text{KOF/Woche}$ erhielten, hatten eine ca. 4-mal höhere Wahrscheinlichkeit eine 30%ige Verbesserung zu erreichen, als die mit einer Dosis von $< 10 \text{ mg/m}^2 \cdot \text{KOF/Woche}$ behandelten Patienten (73,7% vs. 43,5%; Chi^2 -Test, $p=0,006$); OR=3,6 [95%CI 1,5-8,8]. Auch für das Erreichen einer 50%igen Verbesserung war die MTX-Dosis von $\geq 10 \text{ mg/m}^2 \cdot \text{KOF/Woche}$ ein statistisch signifikanter Prädiktor (*Tabelle 11*).

Tabelle 11: MTX-Dosierung und Ansprechen auf MTX nach 6 Therapiemonaten

	Dosis von MTX*		p [#]	OR [95%CI]
	$\geq 10 \text{ mg/m}^2$	$< 10 \text{ mg/m}^2$		
Keine bzw. < 30% Verbesserung	49	13	0,006	3,8 [1,5 - 8,8]
$\geq 30\%$ Verbesserung	137	10		
$\geq 50\%$ Verbesserung	116	7	0,006	3,8 [1,5 - 9,7]
$\geq 70\%$ Verbesserung	78	5	0,07	-
Keine Krankheitsaktivität	22	1	0,48	-

*In „mg/m²*KOF/Woche“. [#]Exakter Test nach Fisher bzw. Chi^2 -Test.

Auch die Anzahl der arthritischen Gelenke bei Therapiebeginn war mit der Wahrscheinlichkeit einer 30%igen bzw. 50%igen Verbesserung signifikant assoziiert (Mann-Whitney-Test, $p<0,001$. *Tabelle 12*).

Die Patienten mit einer Polyarthrits erreichten eine 30%ige Verbesserung signifikant häufiger, als die mit einer Oligoarthrits (83,2% vs. 56,7%; Chi^2 -Test, $p<0,001$); OR=3,8 [95%CI 1,9-7,1].

Auch hinsichtlich der 50%igen Verbesserung zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied (70,1% vs. 47,1%; Chi^2 -Test, $p=0,001$); OR=2,6 [95%CI 1,5-4,6].

Bezüglich der Häufigkeit einer 70%igen Verbesserung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit einer Polyarthrititis und denjenigen mit einer Oligoarthrititis (Chi²-Test, p>0,05).

Tabelle 12: Anzahl der arthritischen Gelenke bei Therapiebeginn und Ansprechen auf MTX nach 6 Monaten

	Anzahl der arthritischen Gelenke vor MTX-Therapiebeginn		p [#]
	Polyarthrititis (n=107)	Oligoarthrititis (n=104)	
Keine bzw. < 30% Verbesserung	18	45	<0,001
≥ 30% Verbesserung	89	59	
≥ 50% Verbesserung	75	49	0,001
≥ 70% Verbesserung	46	38	0,40
Keine Krankheitsaktivität	8	15	0,13

[#]Exakter Test nach Fisher bzw. Chi²-Test, p-Werte>0,05 = statistisch nicht signifikant.

Für die initialen BSG- und CRP-Werte konnte keine Korrelation zur MTX-Wirksamkeit nachgewiesen werden (Mann-Whitney-Test, p>0,05; *Tabelle 13*).

Begleittherapien mit Steroiden bzw. NSAR zeigten ebenso keinen Zusammenhang mit dem Ansprechen auf MTX (*Tabelle 13*). 12 von 21 Patienten (57,1%), die gleichzeitig mit Steroiden behandelt wurden, und 136 von 190 Patienten (71,6%), die keine Steroide erhielten, zeigten eine Verbesserung um ≥30% (Chi²-Test, p>0,05). 142 von 203 Patienten (70%), die gleichzeitig NSAR bekamen, und 3 von 4 Patienten (75%), die ohne NSAR behandelt wurden, erreichten eine 30%ige Verbesserung (Chi²-Test, p>0,05). Auch die Supplementierung mit Folsäure zeigte keine nachteilige Wirkung auf die Wirksamkeit der MTX-Therapie (Chi²-Test, p>0,05).

Tabelle 13 gibt einen Überblick über die Verteilung der untersuchten Parameter zwischen den Patienten mit bzw. ohne eine 30%ige Verbesserung der Krankheitsaktivität nach 6 Monaten unter MTX-Therapie.

Tabelle 13: Ansprechen auf MTX nach 6 Therapiemonaten (n=211)

	Ansprechen auf MTX nach 6 Therapiemonaten		p [#]
	≥ 30% Besserung (n=148)	Keine oder < 30% Besserung (n=63)	
Geschlecht:			
männlich	53	22	0,90 ¹
weiblich	95	41	
Alter bei MTX-Therapiebeginn (Jahre)	8,3 ± 4,3 (8,0)	8,5 ± 4,5 (8,0)	0,91 ³
Erkrankungsdauer bei MTX-Therapiebeginn (Jahre)	1,9 ± 2,6 (1,0)	2,3 ± 2,7 (1,0)	0,23 ³
MTX-Dosis (mg/m ² *KOF/Woche)	12,9 ± 2,1 (13,0)*	12,0 ± 2,8 (12,3)**	0,03 ²
Begleittherapien:			
Steroide oral [§]	12	9	0,21 ¹
NSAR	142	61	1,00 ¹
Supplementierung mit Folsäure	38	18	0,61 ¹
Krankheitsaktivität bei MTX-Therapiebeginn:			
Anzahl der Gelenke mit einer Arthritis	9,8 ± 9,4 (5,0)	4,9 ± 5,4 (3,0)	<0,001 ³
davon Polyarthrititis	89	18	<0,001 ¹
Oligoarthrititis	59	45	
Anzahl der eingeschränkten Gelenke	8,8 ± 9,6 (5,0)	5,5 ± 5,4 (4,0)	0,011 ³
BSG (mm/h)	41,8 ± 30,6 (32,5)	42,4 ± 33,2 (36,5)	0,93 ³
CRP(mg/dl)	2,7 ± 4,3 (1,1)	2,7 ± 5,1 (0,8)	0,19 ³

Angaben für quantitative Variablen: Mittelwert ± SD (Median). Angaben für kategoriale Variablen: absolute Häufigkeit (Anzahl der Patienten).

¹Chi-Quadrat-Test bzw. exakter Test nach Fisher. ²T-Test bei unabhängigen Stichproben. ³Mann-Whitney-Test. [#]p-Werte>0,05 = statistisch nicht signifikant.

*Bei 10 Patienten bzw. **bei 13 Patienten war die MTX-Dosis <10mg/m²*KOF/Woche.

[§]In einer Dosis ≤0,5mg/kg*KG/Tag Prednisolonäquivalent (maximal 10mg/Tag); IQR 0,15-0,4mg/kg*KG/Tag.

3.2.2.1. MTHFR C677T-Polymorphismus und Ansprechen auf MTX nach 6 Monaten

67 von 97 (69,1%) Patienten mit dem 677CC-Genotyp, 61 von 89 (68,5%) Patienten mit dem 677CT-Genotyp und 18 von 23 (78,3%) Patienten mit dem 677TT-Genotyp zeigten eine Verbesserung der Krankheitsaktivität um mindestens 30% nach 6 Therapiemonaten unter MTX. Es zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der 30%igen Verbesserung sowohl zwischen den Patienten mit einzelnen Genotypen, als auch zwischen den Patienten mit dem 677CC-Genotyp und 677T-Allelträgern (Chi²-Test bzw. exakter Test nach Fisher, $p > 0,05$; *Tabelle 14*). Auch hinsichtlich der 50%igen und 70%igen Verbesserung konnte kein Zusammenhang mit einzelnen C677T-Genotypen bzw. mit dem 677T-Allel nachgewiesen werden (Chi²-Test bzw. exakter Test nach Fisher, $p > 0,05$). Die 677T-Allelträger waren wahrscheinlicher, eine komplette Krankheitsinaktivität nach 6 Therapiemonaten zu erreichen, als die mit dem 677CC-Genotyp (exakter Test nach Fisher, $p = 0,012$), es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den 677CC- und 677TT-Patienten (exakter Test nach Fisher, $p > 0,05$).

Tabelle 14: Ansprechen auf MTX nach 6 Monaten unter Patienten mit einzelnen C677T-Genotypen (n=209)

	C677T-Genotyp			p [#]
	CC (n=97)	CT (n=89)	TT (n=23)	
Keine bzw. < 30% Verbesserung	30	28	5	0,65
≥ 30% Verbesserung	67	61	18	
≥ 50% Verbesserung	59	50	14	0,80
≥ 70% Verbesserung	41	31	11	0,41
Keine Krankheitsaktivität	16	1	5	0,001*

[#]Exakter Test nach Fisher bzw. Chi²-Test, p-Werte $> 0,05$ = statistisch nicht signifikant.

*Für den Gruppenvergleich „677CC vs. 677T-Allel“: $p = 0,012$, OR=3,5 [95%CI 1,3-9,3]. Für „677CC vs. 677TT“: $p > 0,05$.

3.2.2.2. MTHFR A1298C-Polymorphismus und Ansprechen auf MTX nach 6 Monaten

70 von 102 (68,6%) Patienten mit dem 1298AA-Genotyp, 53 von 78 (67,9%) Patienten mit dem 1298AC-Genotyp und 24 von 30 (80%) Patienten mit dem 1298CC-Genotyp zeigten eine Verbesserung ihrer Krankheitsaktivität um mindestens 30% nach 6 Therapiemonaten. Es ergab sich kein Unterschied in der Häufigkeit der 30%igen Verbesserung sowohl zwischen Patienten mit dem 1298AA-Genotyp und 1298C-Allelträgern (1298AC+1298CC), als auch zwischen Patienten mit einzelnen Genotypen (Chi²-Test bzw. exakter Test nach Fisher, $p > 0,05$; *Tabelle 15*). Ebenso konnte kein Zusammenhang hinsichtlich der 50%igen und 70%igen Verbesserung gefunden werden (Chi²-Test bzw. exakter Test nach Fisher, $p > 0,05$).

Tabelle 15: Ansprechen auf MTX nach 6 Monaten unter Patienten mit einzelnen A1298C-Genotypen (n=210)

	A1298C-Genotyp			p [#]
	AA (n=102)	AC (n=78)	CC (n=30)	
Keine bzw. < 30% Verbesserung	32	25	6	0,43
≥ 30% Verbesserung	70	53	24	
≥ 50% Verbesserung	61	44	18	0,89
≥ 70% Verbesserung	44	30	9	0,42
Keine Krankheitsaktivität	11	8	3	0,99

[#]Exakter Test nach Fisher bzw. Chi²-Test, p-Werte $> 0,05$ = statistisch nicht signifikant.

3.2.2.3. Ansprechen auf MTX nach 6 Therapiemonaten: Regressionsanalyse der Einflussvariablen

Des Weiteren wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt, um ein prädiktives Modell zu konstruieren, mit dem das Erreichen oder Nichterreichen einer 30%igen Verbesserung der klinischen Krankheitsaktivität nach 6 Monaten unter MTX-Therapie vorhergesagt werden konnte, und um die Quotenverhältnisse jeder unabhängigen Einflussvariable im Modell zu schätzen. Wenn alle untersuchten Variablen zusammen im Modell analysiert wurden, zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang des Modells zur MTX-Wirksamkeit nach 6 Therapiemonaten ($\chi^2=26,24$; $df=11$, $n=190$, $p=0,006$). Zwischen 12,5% und 18,4% der Wahrscheinlichkeit des Erreichens oder Nichterreichens einer 30%igen Verbesserung konnte durch das Modell vorhergesagt werden (Cox&Snell $R^2=0,125$; Nagelkerkes $R^2=0,184$). Das Ansprechen konnte bei insgesamt 75,3% der Patienten korrekt vorhergesagt werden, dabei schien das Modell für die Vorhersage der Wahrscheinlichkeit einer Verbesserung um $\geq 30\%$ besser geeignet zu sein (94,8% der Patienten wurden korrekt klassifiziert), als für die Vorhersage des Nichtansprechens (27,3% der Patienten wurden richtig klassifiziert). An einzelnen Variablen zeigten lediglich die MTX-Dosis (OR=3,33 [95%CI 1,28-8,69]) und die Anzahl der arthritischen Gelenke (OR=0,91; [95%CI 0,85-0,97]) eine statistisch signifikante Assoziation zur Wahrscheinlichkeit der 30%igen Verbesserung.

Tabelle 16: Logistische Regressionsanalyse: Ansprechen auf MTX nach 6 Therapiemonaten

	B ¹	SE ²	p ³	OR ⁴	95% CI ⁵	
Geschlecht	0,387	0,374	0,300	1,473	0,708	3,066
Alter ⁵	-0,019	0,048	0,697	0,982	0,894	1,077
Erkrankungsdauer ⁵	0,040	0,072	0,577	1,041	0,904	1,198
MTHFR-677T-Allel	-0,240	0,371	0,517	0,787	0,381	1,626
MTHFR-1298C-Allel	-0,375	0,370	0,311	0,688	0,333	1,420
MTX-Dosis $\geq 10\text{mg/m}^2/\text{Woche}$	1,204	0,489	0,014	3,334	1,279	8,689
Anzahl der arthritischen Gelenke ⁵	-0,100	0,034	0,003	0,905	0,847	0,967
BSG ⁵	0,000	0,006	0,944	1,000	0,989	1,012
Steroide ⁵	0,692	0,594	0,244	1,997	0,624	6,393
NSAR	0,341	1,285	0,791	1,406	0,113	17,468
Folatsupplementierung	0,113	0,404	0,780	1,119	0,507	2,469
Konstante	-2,360	1,864	0,206	0,094	-	-

⁵bei MTX-Therapiebeginn. ⁵in einer Dosis $\leq 0,5\text{mg/kg*KG/Tag}$ Prednisolonäquivalent (maximal 10mg/Tag) oral.

¹Regressionskoeffizient-B; ²Standardfehler; ³Signifikanz; ⁴Quotenverhältnis; ⁵Konfidenzintervall

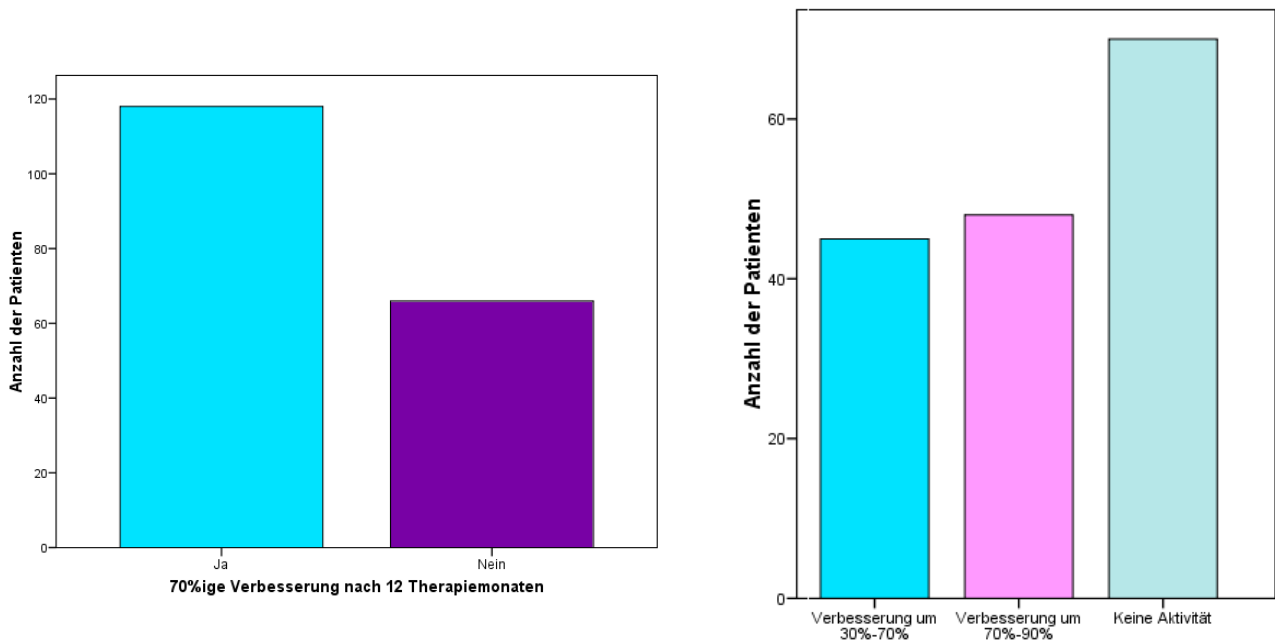
Das Erreichen einer 30%igen Verbesserung der Krankheitsaktivität wurde mit „0“ bzw. das Nichterreichen mit „1“ kodiert.

3.2.3. Ansprechen auf MTX nach 12 Therapiemonaten

Es wurden 184 Patienten in die Analyse eingeschlossen. Als Effektivitätsparameter wurde eine mindestens 70%ige Verbesserung der Krankheitsaktivität nach 12 Therapiemonaten gewählt.

Insgesamt 118 Patienten (64,1%) erreichten eine 70%ige Verbesserung nach dem ersten Behandlungsjahr, bei 70 von diesen war die Erkrankung zu diesem Zeitpunkt inaktiv. 21 Patienten (11,4%) zeigten keine 30%ige Verbesserung der Krankheitsaktivität vom Ausgangswert nach 12 Therapiemonaten (Abbildung 4).

Abb. 4: Ansprechen auf MTX nach 12 Therapiemonaten (n=184)



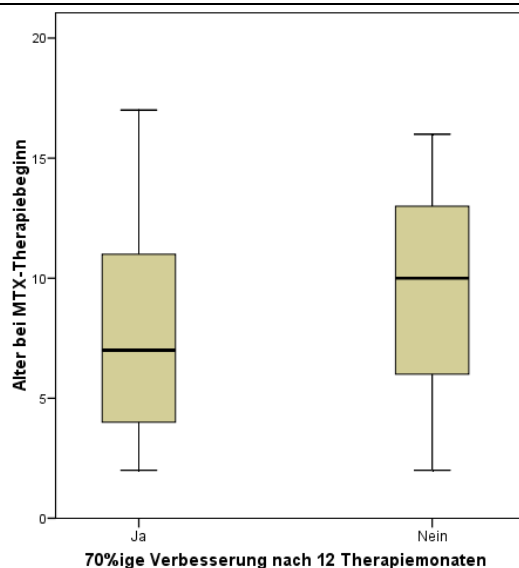
a. Häufigkeit einer 70%igen Verbesserung unter 184 Patienten

b. Patienten mit einer mindestens 30%igen Verbesserung (n=163)

Das Geschlecht der Patienten, Kategorie der JIA, Erkrankungsdauer vor MTX-Behandlungsbeginn, Kombinationstherapien mit Steroiden und/oder NSAR, sowie die prophylaktische Supplementierung mit Folsäure zeigten keinen Zusammenhang mit der Wahrscheinlichkeit einer 70%igen Verbesserung (*Tabelle 19*). Für das Alter der Patienten und für die Anzahl der arthritischen Gelenke bei MTX-Therapiebeginn, sowie für die Dosierung von MTX ergab sich eine statistisch signifikante Assoziation zur MTX-Wirksamkeit (*Tabelle 19*).

Die Patienten, die eine 70%ige Verbesserung der Krankheitsaktivität nach 12 Therapiemonaten erreichten, waren bei MTX-Therapiebeginn im Durchschnitt um 1,8 Jahre jünger [95%CI der Differenz: 0,6 – 3,0 Jahre], als die mit einer Verbesserung um <70% (*Tabelle 19 und Abbildung 5*); dieser Unterschied war statistisch signifikant (Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$).

Abb. 5: Altersverteilung der Patienten mit bzw. ohne eine 70%ige Verbesserung nach 12 Monaten



Mittlere Altersdifferenz zwischen den Gruppen: 1,8 Jahre [95%CI 0,6 – 3,0 Jahre]. Mann-Whitney-Test, $p = 0,003$.

Die Dosis von MTX war ebenso statistisch signifikant mit der Wahrscheinlichkeit einer 70%igen Verbesserung assoziiert (*Tabelle 17* und *Tabelle 19*). Bei MTX-Dosierungen $\geq 10 \text{ mg/m}^2 \cdot \text{KOF/Woche}$ zeigte sich eine signifikant höhere Häufigkeit der 70%igen Verbesserung als bei Dosierungen von $< 10 \text{ mg/m}^2 \cdot \text{KOF/Woche}$ (67,9% vs. 29,4%; exakter Test nach Fisher, $p=0,003$); OR=5,1 [95%CI 1,7-15,1]).

Tabelle 17: Ansprechen auf MTX nach 12 Monaten abhängig von MTX-Dosierung

	Dosis von MTX*	
	$\geq 10 \text{ mg/m}^2$	$< 10 \text{ mg/m}^2$
< 70% Verbesserung	53	12
$\geq 70\%$ Verbesserung	112	5

*Dosierungen in „ $\text{mg/m}^2 \cdot \text{KOF/Woche}$ “. Exakter Test nach Fisher, $p=0,003$.

Auch die Anzahl der arthritischen Gelenke bei MTX-Therapiebeginn zeigte einen Zusammenhang zur Wahrscheinlichkeit der 70%igen Verbesserung (Mann-Whitney-Test, $p=0,016$; *Tabelle 19*). Dabei erreichten die Patienten mit einer Polyarthrititis eine 70%ige Verbesserung im Durchschnitt 2-mal häufiger, als die mit einer Oligoarthrititis (exakter Test nach Fisher, $p=0,046$); OR = 1,9 [95%CI 1,03-3,50]. Das Ansprechen auf MTX nach den ersten 6 Therapiemonaten war mit der Wahrscheinlichkeit einer 70%igen Verbesserung nach 12 Monaten ebenso statistisch signifikant assoziiert (Chi^2 -Test, $p<0,001$). Die Häufigkeit einer 70%igen Verbesserung war bei Patienten, die nach 6 Monaten eine mindestens 30%ige Verbesserung der Krankheitsaktivität zeigten, 6-fach höher im Vergleich mit Patienten, die eine 30%ige Verbesserung nicht erreichten (*Tabelle 18*); OR = 5,8 [95%CI 2,8-11,8]. 16 von insgesamt 48 Patienten (33%), die nach 6 Therapiemonaten noch keine 30%ige Verbesserung zeigten, erreichten eine 70%ige Verbesserung der Krankheitsaktivität nach dem ersten Behandlungsjahr.

Tabelle 18: MTX-Wirksamkeit nach 6 und 12 Therapiemonaten (n=176)

Ansprechen nach 6 Monaten	Ansprechen nach 12 Monaten	
	Verbesserung um $\geq 70\%$	Verbesserung um $< 70\%$
Verbesserung um $\geq 30\%$	95	33
Keine bzw. $< 30\%$ Verbesserung	16	32

Chi^2 -Test, $p<0,001$. OR=5,8 [95%CI 2,8-11,8].

Tabelle 19 zeigt die Verteilung der untersuchten Parameter zwischen den Patienten mit bzw. ohne eine 70%ige Verbesserung der Krankheitsaktivität nach dem ersten Behandlungsjahr mit MTX.

Tabelle 19: Ansprechen auf MTX nach 12 Therapiemonaten (n=184)

	Ansprechen auf MTX nach 12 Therapiemonaten		p [#]
	Verbesserung um $\geq 70\%$ (n=118)	Verbesserung um $< 70\%$ (n=66)	
Geschlecht:			
männlich	35	23	0,51 ¹
weiblich	83	43	
Alter bei MTX-Therapiebeginn (Jahre)	7,5 \pm 4,1 (7,0)	9,3 \pm 3,9 (10,0)	0,003 ³
Erkrankungsdauer vor MTX-Therapiebeginn (Jahre)	1,8 \pm 2,1 (1,0)	2,3 \pm 2,7 (1,0)	0,23 ³
MTX-Dosis (mg/m ² *KOF/Woche)	12,9 \pm 1,9 (13,0)*	12,3 \pm 2,6 (12,5)**	0,05 ²
Begleittherapien:			
Steroide oral [§]	7	9	0,10 ¹
NSAR	114	64	1,00 ¹
Supplementierung mit Folsäure	28	19	0,48 ¹
Krankheitsaktivität bei MTX-Therapiebeginn:			
Anzahl der Gelenke mit Arthritis	9,9 \pm 10,1 (5,0)	6,3 \pm 6,0 (4,0)	0,016 ³
davon Polyarthrit	67	27	0,046 ¹
Oligoarthrit	51	39	
Anzahl der eingeschränkten Gelenke	8,5 \pm 8,6 (5,0)	7,5 \pm 10,3 (4,0)	0,25 ³
BSG (mm/h)	42,9 \pm 30,4 (34,0)	39,7 \pm 30,4 (30,0)	0,41 ³
CRP (mg/dl)	2,6 \pm 4,2 (1,1)	2,6 \pm 4,4 (1,0)	0,53 ³

Angaben für quantitative Variablen: Mittelwert \pm SD (Median). Angaben für kategoriale Variablen: absolute Häufigkeit (Anzahl der Patienten).

¹Chi-Quadrat-Test bzw. exakter Test nach Fisher. ²T-Test bei unabhängigen Stichproben. ³Mann-Whitney-Test. [#]p-Werte>0,05 = statistisch nicht signifikant.

*Bei 5 Patienten bzw. **bei 12 Patienten war die MTX-Dosis $< 10 \text{ mg/m}^2 \cdot \text{KOF/Woche}$.

[§]In einer Dosis $\leq 0,5 \text{ mg Prednisolonäquivalent/kg} \cdot \text{KG/Tag}$ (maximal 10mg/Tag); IQR 0,15-0,4mg/kg*KG/Tag.

3.2.3.1. MTHFR C677T-Polymorphismus und Ansprechen auf MTX nach 12 Monaten

52 von 83 Patienten (62,7%) mit dem 677CC-Genotyp, 53 von 80 Patienten (66,3%) mit dem 677CT-Genotyp und 11 von 19 Patienten (57,9%) mit dem 677TT-Genotyp zeigten eine mindestens 70%ige Verbesserung nach 12 Therapiemonaten. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied sowohl zwischen Patienten mit einzelnen Genotypen, als auch zwischen Patienten mit dem 677CC-Genotyp und 677T-Allelträgern (Chi²-Test, p>0,05).

Tabelle 20: Ansprechen auf MTX nach 12 Monaten unter Patienten mit einzelnen C677T-Genotypen (n=182)

	C677T-Genotyp		
	CC (n=83)	CT (n=80)	TT (n=19)
$\geq 70\%$ Verbesserung	52	53	11
$< 70\%$ Verbesserung	31	27	8

Chi²-Test, p>>0,05.

3.2.3.2. MTHFR A1298C-Polymorphismus und Ansprechen auf MTX nach 12 Monaten

66 von 107 Patienten (61,7%) mit dem 1298AA-Genotyp, 41 von 68 Patienten (60,3%) mit dem 1298AC-Genotyp sowie 21 von 33 Patienten (63,6%) mit dem 1298CC-Genotyp konnten eine 70%ige Verbesserung der Krankheitsaktivität nach 12 Therapiemonaten erreichen. Auch hier zeigte sich kein Unterschied sowohl zwischen Patienten mit einzelnen Genotypen, als auch zwischen Patienten mit dem 1298AA-Genotyp und 1298C-Allelträgern (Chi²-Test, p>0,05).

Tabelle 21: Ansprechen auf MTX nach 12 Monaten unter Patienten mit einzelnen A1298C-Genotypen (n=183)

	A1298C-Genotyp		
	1298 AA (n=93)	1298 AC (n=63)	1298 CC (n=27)
≥ 70% Verbesserung	60	38	19
<70% Verbesserung	33	25	8

Chi²-Test, p>>0,05.**3.2.3.3. Ansprechen auf MTX nach 12 Therapiemonaten: Regressionsanalyse der Einflussvariablen**

Die logistische Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um ein prädiktives Modell zu konstruieren, mit dem das Erreichen oder Nichterreichen einer 70%igen Verbesserung der klinischen Krankheitsaktivität nach 12 Monaten unter MTX-Therapie vorhergesagt werden konnte, und um die Quotenverhältnisse jeder unabhängigen Einflussvariable im Modell zu schätzen. Wenn alle untersuchten Variablen zusammen im Modell analysiert wurden, zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang des Modells zur MTX-Wirksamkeit nach dem ersten Behandlungsjahr (Chi²=23,64; df=11, n=156, p=0,014). Zwischen 14,1% bis 19,2% der Wahrscheinlichkeit des Erreichens oder Nichterreichens einer 70%igen Verbesserung konnte durch das Modell vorhergesagt werden (Cox & Snell R²= 0,141; Nagelkerkes R²=0,192). Das Ansprechen konnte bei insgesamt 72,4% der Patienten korrekt vorhergesagt werden, dabei zeigte sich das Modell für die Vorhersage der Wahrscheinlichkeit einer Verbesserung um ≥70% besser geeignet (91,9% der Patienten wurden korrekt klassifiziert), als für die Vorhersage des Nichtansprechens (38,6% der Patienten wurden richtig klassifiziert). Wenn die einzelnen Variablen nicht in der Gleichung analysiert wurden, zeigten die Variablen „Alter der Patienten bei MTX-Therapiebeginn“ (p=0,027), „Anzahl der arthritischen Gelenke bei MTX-Therapiebeginn“ (p=0,017) und „MTX-Dosis“ (p=0,001) einen statistisch signifikanten Zusammenhang zur MTX-Wirksamkeit. Innerhalb des Modells ergab sich lediglich für die MTX-Dosis (OR=4,23 [95%CI 1,20-14,91]) und für die Anzahl der arthritischen Gelenke (OR=0,95; [95%CI 0,90-0,99]) eine statistisch signifikante Assoziation zur Wahrscheinlichkeit einer 70%igen Verbesserung (Tabelle 22). Das „Alter bei MTX-Therapiebeginn“ war nicht signifikant mit dem Therapieansprechen assoziiert. Dies kann auf unterschiedliche Faktoren zurückzuführen sein. Unter anderem zeigte das „Alter bei MTX-Therapiebeginn“ eine geringe, aber statistisch signifikante Korrelation zu den Variablen „MTX-Dosis“ (r=0,22; p=0,03) und „Anzahl der arthritischen Gelenke“ (r=0,19; p=0,009), sodass bei Einschluss letzter Parameter in das Modell das „Alter bei Therapiebeginn“ keine weitere Relevanz haben musste.

Tabelle 22: Logistische Regressionsanalyse: Ansprechen auf MTX nach 12 Therapiemonaten

	B ¹	SE ²	p ³	OR ⁴	95% CI ⁵	
Geschlecht	0,009	0,395	0,981	1,009	0,466	2,187
Alter ⁵	0,088	0,051	0,083	1,092	0,989	1,206
Erkrankungsdauer ⁵	0,012	0,082	0,883	1,012	0,861	1,190
MTHFR-677T-Allel	0,100	0,398	0,801	1,105	0,507	2,409
MTHFR-1298C-Allel	-0,388	0,397	0,328	0,679	0,312	1,476
MTX-Dosis ≥10mg/m ² /Woche	1,442	0,643	0,025	4,227	1,199	14,906
Anzahl der arthritischen Gelenke ⁵	-0,054	0,026	0,042	0,948	0,900	0,998
BSG ⁵	-0,005	0,006	0,472	0,995	0,983	1,008
Steroide ⁸	1,007	0,657	0,126	2,737	0,755	9,928
NSAR	-0,207	1,366	0,880	0,813	0,056	11,820
Folatsupplementierung	0,508	0,423	0,230	1,661	0,725	3,805
Konstante	-2,890	1,921	0,133	0,056	-	-

⁵bei MTX-Therapiebeginn. ⁸in einer Dosis ≤0,5mg/kg*KG/Tag Prednisolonäquivalent (maximal 10mg/Tag) oral.¹Regressionskoeffizient-B; ²Standardfehler; ³Signifikanz; ⁴Quotenverhältnis; ⁵Konfidenzintervall

Das Erreichen einer 70%igen Verbesserung der Krankheitsaktivität wurde mit „0“ bzw. das Nichterreichen mit „1“ kodiert.

3.3. Bewertung der Verträglichkeit der MTX-Therapie

Alle 277 Patienten wurden in die Analyse eingeschlossen. Nur die Nebenwirkungen wurden berücksichtigt, die eindeutig auf die MTX-Therapie zurückzuführen waren.

Bei 228 von 277 Patienten (82,3%) traten MTX-Nebenwirkungen auf. Bei 176 Patienten traten die ersten Nebenwirkungen bereits im ersten Behandlungsjahr auf, von diesen bei 78 Patienten während der ersten 3 Monate.

Es wurden insgesamt 507 unerwünschte Ereignisse gemeldet. Am häufigsten wurden gastrointestinale (GI) Nebenwirkungen (bei 150 Patienten) sowie eine Erhöhung der Transaminasen (bei 112 Patienten) beobachtet. Bei 73 Patienten entwickelte sich im Therapieverlauf eine Aversion gegenüber MTX.

Tabelle 23 gibt einen Überblick über die gemeldeten MTX-assoziierten Nebenwirkungen.

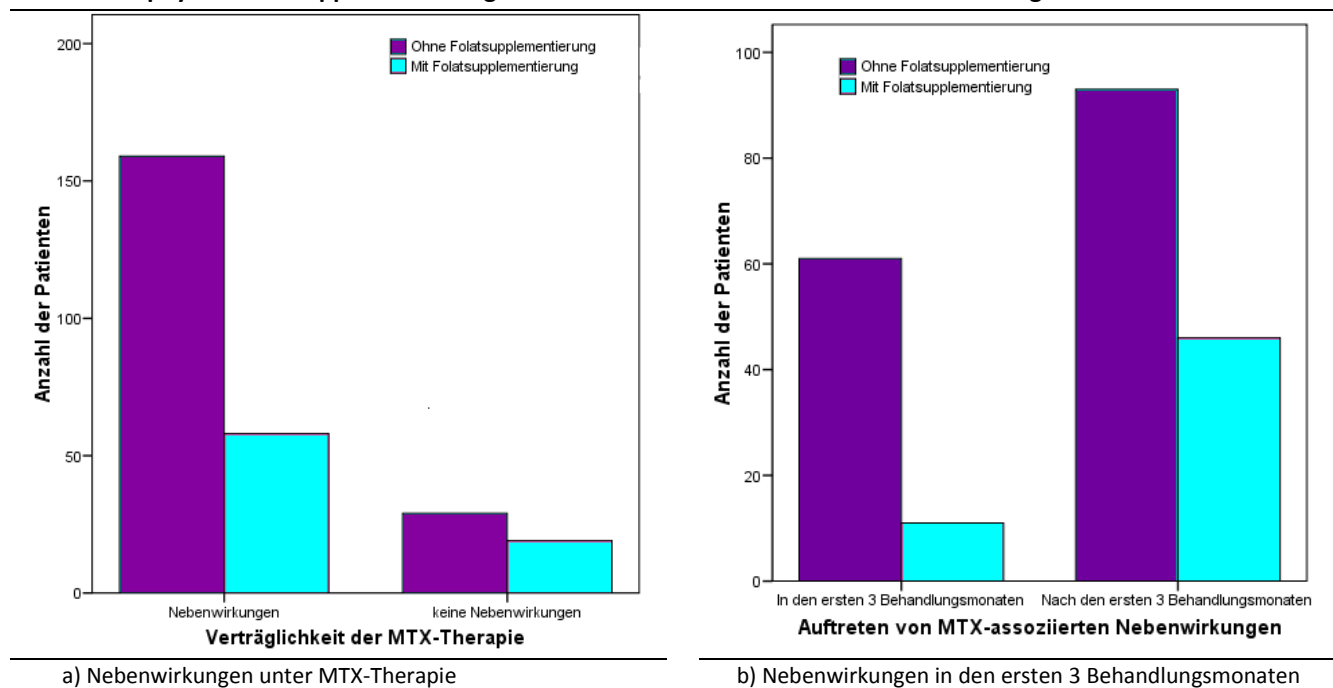
Tabelle 23: Häufigkeiten der MTX-assoziierten Nebenwirkungen (n=277)		
	Anzahl	%
GI-Symptome insgesamt	150	54,2
Übelkeit	146	52,7
Erbrechen	84	30,3
Bauchschmerzen	15	5,4
Ekelgefühl gegenüber MTX	73	26,4
Transaminasenerhöhung	112	40,4
Orale Aphthen (Orale Mukositis)	15	5,4
Aphthen im Genitalbereich	2	0,7
Neurologische Symptome insgesamt (Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schwächegefühl, Schwindel)	10	3,6
Gehäufte Infektionen	10	3,6
Haarausfall	7	2,5
Reizhusten	2	0,7
Allergisches Exanthem	4	1,3
Leukopenie	7	2,5
Neutropenie	5	1,8
Lymphopenie	2	0,7
Anämie	2	0,7
Proteinurie	4	1,3
Hämaturie	2	0,7
Warzenbildung	2	0,7
Juckreiz	1	0,3
Nodulosis	1	0,3

Das Auftreten von Nebenwirkungen war weder mit der MTX-Dosierung noch mit dem Vorhandensein der Begleittherapien wie NSAR, Steroide oder DMARDs assoziiert (*Tabelle 24*).

Die prophylaktische Supplementierung von Folsäure zeigte keinen Zusammenhang mit dem Auftreten von Nebenwirkungen (Chi^2 -Test, $p=0,08$). Bei Patienten ohne Folatsupplementierung traten die Nebenwirkungen jedoch früher im MTX-Therapieverlauf auf, als bei Patienten, die von MTX-Therapiebeginn an Folsäure erhielten (Chi^2 -Test, $p=0,002$). So kam es bei 61 von insgesamt 183 Patienten ohne Folatsupplementierung bereits in den ersten 3 Monaten der MTX-Therapie zu Nebenwirkungen, im Gegensatz zu 11 von 76 Patienten, die gleichzeitig Folsäure erhielten (*Abbildung 6*); $\text{OR} = 2,96$ [95%CI 1,45-6,0]. Bezüglich der Nebenwirkungen, die im späteren Therapieverlauf auftraten, zeigte die prophylaktische Folsäuresupplementierung keine signifikant schützende Wirkung;

Nebenwirkungen wurden bei 46/65 (70,8%) Patienten mit bzw. bei 93/122 (76,2%) Patienten ohne Folatsupplementierung beobachtet (Chi²-Test, p>0,05).

Abb. 6. Prophylaktische Supplementierung mit Folsäure und MTX-assoziierte Nebenwirkungen



Patienten, die unter Nebenwirkungen litten, waren bei MTX-Behandlungsbeginn im Mittel um 1,1 Jahre [95%CI 0,04 – 2,26] älter als die ohne Nebenwirkungen. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (Mann-Whitney-Test, p=0,022).

Tabelle 24 zeigt die Verteilung der untersuchten Parameter zwischen den Patienten mit und ohne MTX-assoziierte Nebenwirkungen.

Tabelle 24: Eigenschaften der Patienten mit und ohne MTX-assoziierte Nebenwirkungen (n=277)

	Mit Nebenwirkungen (n=228)	Ohne Nebenwirkungen (n=49)	p [#]
Geschlecht:			
männlich	81	21	0,33 ¹
weiblich	147	28	
Alter bei MTX-Therapiebeginn (Jahre) [§]	8,8 ± 4,1 (9,0)	7,5 ± 5,3 (5,0)	0,022 ³
Dosierung von MTX (mg/m ² *KOF/Woche)	12,7 ± 2,3 (12,9)	12,7 ± 2,6 (13,0)	0,96 ²
Begleittherapien:			
DMARD(s)/Biologika	47	11	0,85 ¹
Steroide oral	39	13	0,16 ¹
NSAR	213	43	0,14 ¹
Supplementierung mit Folsäure*	58	19	0,08 ¹

Angaben für quantitative Variablen: Mittelwert ± SD (Median). Angaben für kategoriale Variablen: absolute Häufigkeiten.

[§]Mittlere Altersdifferenz: 1,1 Jahre [95%CI 0,04-2,26 Jahre].

[#]p-Werte >0,05 = statistisch nicht signifikant. ¹Chi-Quadrat-Test bzw. exakter Test nach Fisher. ²T-Test bei unabhängigen Stichproben. ³Mann-Whitney-Test.

*Prophylaktische Supplementierung mit Folsäure seit MTX-Therapiebeginn. OR = 1,8 [95%CI 0,94 - 3,45].

Die am häufigsten vorkommenden Nebenwirkungen wurden auch einzeln analysiert.

GI-Symptome

GI-Nebenwirkungen traten bei 150 Patienten auf, 69 Patienten (49%) stuften dabei ihre Symptome als schwer ein (anhaltende Übelkeit mit einem Erbrechen >1-mal über 24 Stunden nach der MTX-Einnahme). Bei 104 Patienten (69%) traten die GI-Symptome bereits im ersten Behandlungsjahr auf. Bei 50 von 150 Patienten musste die MTX-Behandlung aufgrund der GI-Nebenwirkungen abgebrochen werden.

Die prophylaktische Supplementierung mit Folsäure zeigte keinen Zusammenhang mit dem Auftreten von GI-Nebenwirkungen (Chi²-Test, $p > 0,05$). Auch hinsichtlich der GI-Symptome während der ersten 3 Behandlungsmonate ergab sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang (exakter Test nach Fisher, $p = 0,096$).

Tabelle 25: GI-Nebenwirkungen unter MTX und Folatsupplementierung

	GI-Nebenwirkungen unter MTX	
	Ja	Nein
Ohne Folsäure (n=188)	103	85
Mit Folsäure* (n=77)	38	39
Insgesamt	141	124

*Prophylaktische Supplementierung mit Folsäure seit MTX-Therapiebeginn.
Chi²-Test, $p > 0,05$.

Anstieg der Transaminasen

Bei insgesamt 112 Patienten kam es unter MTX-Therapie zu einem Anstieg der Transaminasen, bei 21 Patienten um das mindestens 2,5-fache über die altersspezifische Normgrenze. Bei 47 Patienten (42%) wurde die Transaminasenerhöhung zum ersten Mal während der ersten 3 Therapiemonate beobachtet, bei insgesamt 76 Patienten (68%) im ersten Behandlungsjahr. Bei 15 Patienten musste das MTX aufgrund schwerer oder persistierender Transaminasenerhöhungen abgesetzt werden, bei 5 von diesen bereits im ersten Behandlungsjahr.

Die MTX-assoziierte Transaminasenerhöhung wurde bei Patienten ohne prophylaktische Folatsupplementierung signifikant häufiger beobachtet als bei Patienten, die gleichzeitig Folsäure erhielten (exakter Test nach Fisher, $p < 0,001$); OR = 2,9 [95%CI 1,6-5,3].

Abb. 7. Transaminasenerhöhung unter MTX und Folatsupplementierung

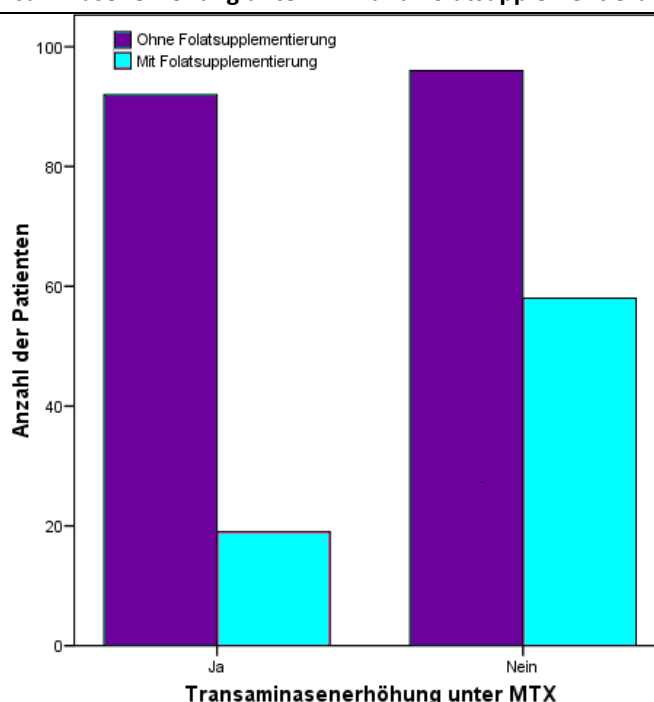


Tabelle 26: Transaminasenerhöhung unter MTX mit und ohne Folatsupplementierung

	Transaminasenerhöhung unter MTX	
	Ja	Nein
Ohne Folsäure (n=188)	92	96
Mit Folsäure* (n=77)	19	58
Insgesamt	111	154

*Prophylaktische Supplementierung mit Folsäure seit MTX-Therapiebeginn.

Exakter Test nach Fisher, $p < 0,001$. OR = 2,93 [95%CI 1,62-5,29].

Bei 21 Patienten wurde die Transaminasenerhöhung als klinisch bedeutsam eingestuft (ein $\geq 2,5$ -facher Anstieg über die altersspezifische Normgrenze; nach Common Toxicity Criteria, Version 2.0), die Häufigkeit zeigte jedoch keinen Zusammenhang mit der Folatsupplementierung (Tabelle 27).

Tabelle 27: Auftreten einer Transaminasenerhöhung mit bzw. ohne Folatsupplementierung

	Transaminasenerhöhung (n=111)	
	<2.5x erhöht [§]	≥ 2.5 x erhöht [§]
Ohne Folsäure (n=92)	73	19
Mit Folsäure* (n=19)	17	2
Insgesamt	90	21

*Prophylaktische Supplementierung mit Folsäure seit MTX-Therapiebeginn.

[§]Referenzwerte: altersspezifische oberste Normgrenze.

Exakter Test nach Fisher, $p > 0,05$.

Erhöhte Infektanfälligkeit

Bei 10 Patienten wurde eine erhöhte Infektanfälligkeit unter MTX-Behandlung beobachtet. Zwei von diesen litten unter rezidivierenden Panaritien. Bei 7 Patienten traten gehäuft banale Infektionen der oberen Luftwege auf, bei einem der Patienten wurden rezidivierende Harnwegsinfektionen beobachtet. Fünf Patienten mussten mit Antibiotika behandelt werden. Schwere Infektionen traten bei keinem der Patienten auf. Keiner der untersuchten Parameter zeigte einen Zusammenhang mit der erhöhten Infektanfälligkeit.

Neurologische Symptome

Neurologische Symptome wie Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schwächegefühl traten bei insgesamt 10 Patienten auf, am häufigsten am Tag der MTX-Einnahme. Die Dauer der Symptome variierte von wenigen Stunden bis 48 Stunden nach der MTX-Einnahme. Keiner der untersuchten Parameter zeigte einen Zusammenhang mit dem Auftreten von neurologischen Symptomen unter MTX-Therapie.

Hämatotoxizität

Bei 7 Patienten trat eine Leukopenie auf, diese wurde bei 3 Patienten als klinisch bedeutsam eingestuft (nach Common Toxicity Criteria, Version 2.0, eine Verminderung der Leukozytenzahl um $>25\%$ von der altersspezifischen Normgrenze). Dabei hatten 2 Patienten eine Lymphopenie 2. Grades ($<75\%$ - $\geq 50\%$ vom altersspezifischen Normwert) bzw. 1 Patient hatte eine Granulozytopenie 3. Grades ($650/\text{mm}^3$). 6 von 7 Patienten erhielten keine prophylaktische Supplementierung mit Folsäure (exakter Test nach Fisher, $p > 0,05$). Lediglich bei einem der Patienten musste die MTX-Therapie aufgrund einer rezidivierenden schweren Leukopenie abgesetzt werden.

Mukositis

Bei 15 Patienten wurde eine orale Mukositis mit rezidivierenden Ulzerationen beobachtet, 2 von denen hatten auch genitale Ulzerationen. 10 von 15 Patienten erhielten keine prophylaktische

Supplementierung mit Folsäure, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (exakter Test nach Fisher, $p > 0,05$). Bei keinem der Patienten musste das MTX wegen der Mukositis abgesetzt werden.

Haarausfall

7 Patienten litten unter Haarausfall während der MTX-Therapie. Keiner der untersuchten Parameter zeigte einen Zusammenhang mit dem Auftreten von Haarausfall.

Für die Nebenwirkungen mit einer Häufigkeit von < 7 wurden keine statistischen Tests durchgeführt.

3.3.1. MTHFR C677T-Polymorphismus und MTX-assoziierte Toxizität

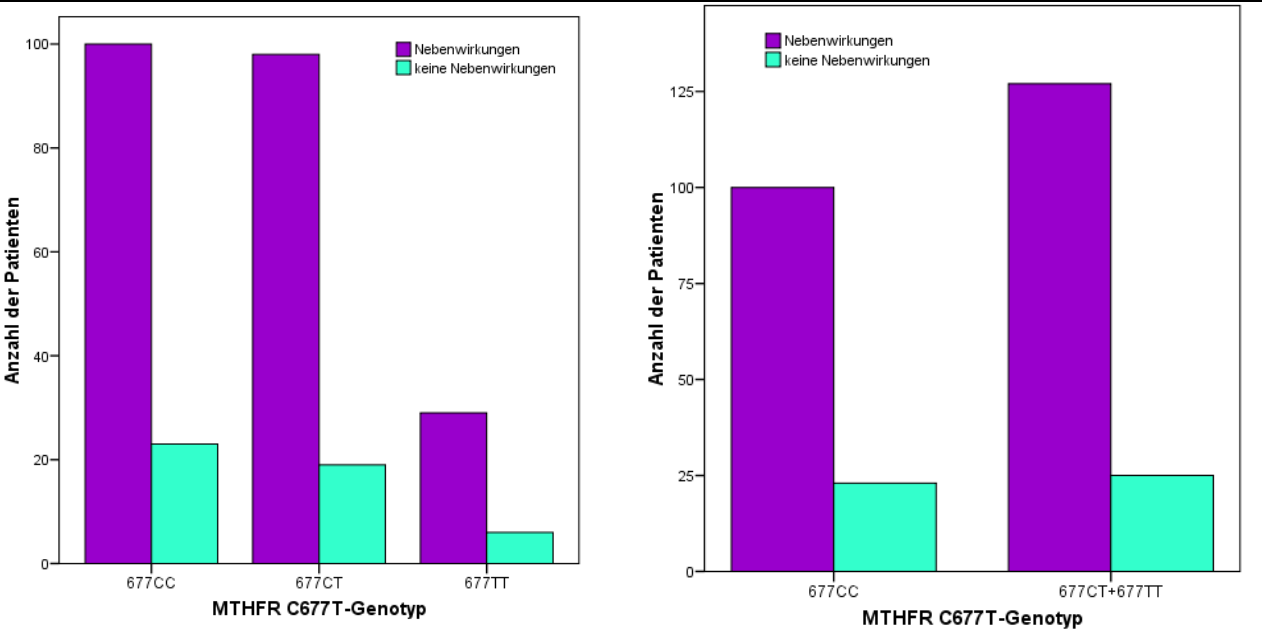
Ein Zusammenhang zwischen dem C677T-SNP und dem Auftreten von MTX-assoziierten Nebenwirkungen wurde bei 275 Patienten untersucht (Tabelle 28, Abbildung 8). Bei 100 von insgesamt 123 Patienten mit dem 677CC-, 98 von 117 Patienten mit dem 677CT- bzw. 29 von 35 Patienten mit dem 677TT-Genotyp traten Nebenwirkungen unter MTX auf. Es zeigte sich kein wesentlicher Unterschied sowohl zwischen einzelnen C677T-Genotypen, als auch zwischen den Patienten mit bzw. ohne das 677T-Allel (χ^2 -Test, $p > 0,05$).

Tabelle 28: MTX-assoziierte Nebenwirkungen unter einzelnen C677T-Genotypen (n=275)

	Nebenwirkungen unter MTX	
	Ja (n=227)	Nein (n=48)
677 CC (n=123)	100	23
677 CT (n=117)	98	19
677 TT (n=35)	29	6

χ^2 -Test bzw. exakter Test nach Fisher, $p > 0,05$.

Abb. 8. MTHFR C677T-Polymorphismus und MTX-Toxizität



a) Patienten mit einzelnen C677T-Genotypen

b) Patienten mit bzw. ohne das 677T-Allel

Außerdem wurde untersucht, ob die Supplementierung mit Folsäure die MTX-Verträglichkeit bei Patienten mit einzelnen C677T-Genotypen unterschiedlich beeinflusst. Wie bereits in *Tabelle 9* gezeigt wurde, unterschied sich die Häufigkeit der prophylaktischen Folatsupplementierung zwischen den Genotypen nicht signifikant.

Unter Patienten, die keine prophylaktische Supplementierung mit Folsäure erhielten, zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit von MTX-assoziierten Nebenwirkungen sowohl zwischen einzelnen C677T-Genotypen, als auch zwischen den Patienten mit und ohne das Variant-Allel (χ^2 -Test sowie exakter Test nach Fisher, $p > 0,05$) (*Tabelle 29*).

Tabelle 29: MTX-assoziierte Nebenwirkungen ohne Folatsupplementierung (n=186)

	Nebenwirkungen unter MTX	
	Ja (n=158)	Nein (n=28)
677 CC (n=82)	68	14
677 CT (n=78)	66	12
677 TT (n=26)	24	2

χ^2 -Test bzw. exakter Test nach Fisher, $p > 0,05$.

Auch unter Patienten, die initial eine Folatsupplementierung erhielten (*Tabelle 30*), ergab sich kein signifikanter Unterschied sowohl zwischen einzelnen C677T-Genotypen, als auch zwischen den Patienten mit bzw. ohne das 677T-Allel (χ^2 -Test sowie exakter Test nach Fisher, $p > 0,05$).

Tabelle 30: MTX-assoziierte Nebenwirkungen unter Folatsupplementierung* (n=77)

	Nebenwirkungen unter MTX	
	Ja (n=58)	Nein (n=19)
677 CC (n=39)	31	8
677 CT (n=31)	24	7
677 TT (n=7)	3	4

*Prophylaktische Supplementierung mit Folsäure seit MTX-Therapiebeginn
 χ^2 -Test bzw. exakter Test nach Fisher, $p > 0,05$. Für den Vergleich „677TT vs. 677CC“: exakter Test nach Fisher, $p = 0,064$; OR=0,19 [95%CI 0,04-1,05].

Unter Patienten mit dem 677TT-Genotyp ergab sich eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der Folatsupplementierung und dem Auftreten von Nebenwirkungen (exakter Test nach Fisher, $p = 0,01$). Die Nebenwirkungen traten bei 3 von 7 Patienten mit einer gleichzeitigen Folatsupplementierung auf, im Gegensatz zu 24 von 26 Patienten ohne Folatsupplementierung (43% vs. 92%; *Tabelle 31*). Unter Patienten mit dem 677CC- bzw. 677CT-Genotyp fand sich hingegen kein wesentlicher Unterschied mit und ohne Folatsupplementierung (83% vs. 79,5% bei 677CC-Patienten, 85% vs. 77% bei 677CT-Patienten).

Tabelle 31: MTX-Verträglichkeit mit bzw. ohne Folatsupplementierung unter Patienten mit einzelnen C677T-Genotypen

	677CC (n=121)			677CT (n=109)			677TT (n=33) [§]		
	Nebenwirkungen unter MTX ^{&}			Nebenwirkungen unter MTX ^{&}			Nebenwirkungen unter MTX ^{&}		
	Ja	Nein	p [#]	Ja	Nein	p [#]	Ja	Nein	p [#]
Ohne Folsäure	68 (82,9)	14 (17,1)	0,63	66 (84,6)	12 (15,4)	0,41	24 (92,3)	2 (7,7)	0,01
Mit Folsäure*	31 (79,5)	8 (20,5)		24 (77,4)	7 (22,6)		3 (42,9)	4 (57,1)	

[&]Anzahl der Patienten (%). *Prophylaktische Supplementierung mit Folsäure seit MTX-Therapiebeginn.

[#]Exakter Test nach Fisher. [§]OR=16,0 [95%CI 2,0-127,9].

Tabelle 32 gibt einen Überblick über die Häufigkeiten einzelner Nebenwirkungen unter Patienten mit 677CC-, 677CT- bzw. 677TT-Genotyp. Ein statistisch gesicherter Zusammenhang konnte lediglich mit

dem Auftreten einer oralen Mukositis nachgewiesen werden (exakter Test nach Fisher, $p=0,026$). Unter MTX traten orale Aphthen bei Patienten mit dem 677TT-Genotyp signifikant häufiger auf, als bei Patienten mit dem 677CC-Genotyp (14,3% vs. 3,3%); OR = 4,96 [95%CI 1,25 - 19,6]. Hinsichtlich der übrigen Nebenwirkungen ergab sich kein statistisch gesicherter Unterschied zwischen den Genotypgruppen.

Tabelle 32: Häufigkeiten der einzelnen Nebenwirkungen bei C677T-Genotypen

	MTHFR C677T-Genotyp*			p [#]
	CC (n=123)	CT (n=117)	TT (n=35)	
GI-Symptome	59 (48)	71 (61)	19 (54)	0,14
Transaminasenerhöhung	48 (39)	50 (43)	13 (37)	0,77
Ekelgefühl	33 (27)	35 (30)	5 (14)	0,18
Mukositis	4 (3,3)	6 (5,1)	5 (14,3)	0,04 ⁰
Neurologische Symptome (Schwindel, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schwächegefühl)	5 (4,1)	4 (3,4)	1 (2,9)	0,93
Gehäufte Infektionen	3 (2,4)	6 (5,1)	1 (2,9)	0,52
Haarausfall	4 (3,3)	3 (2,6)	0	0,56
Leukopenie	2 (1,6)	3 (2,6)	2 (5,7)	0,40
Allergische Exanthem ^{&}	2 (1,6)	2 (1,7)	0	-
Reizhusten ^{&}	1 (0,8)	1 (0,9)	0	-
Anämie ^{&}	1 (0,8)	0	0	-
Proteinurie ^{&}	0	2 (1,7)	0	-
Hämaturie ^{&}	1 (0,8)	0	1 (2,9)	-
Warzenbildung ^{&}	1 (0,8)	1 (0,9)	0	-
Juckreiz ^{&}	1 (0,8)	0	0	-
Nodulosis ^{&}	1 (0,8)	0	0	-

*n=Patientenanzahl (% von Anzahl der Patienten mit dem jeweiligen Genotyp).

[#] Chi²-Test bzw. exakter Test nach Fisher. p-Werte >0,05 = statistisch nicht signifikant.

⁰ Für den Vergleich „677TT vs. 677CC“: exakter Test nach Fisher, $p=0,026$; OR=4,96 [95%CI 1,25-19,6].

[&] Aufgrund der geringen Patientenzahl (<7) p-Werte nicht kalkuliert.

GI-Symptome

Die Häufigkeit der MTX-assoziierten GI-Nebenwirkungen unterschied sich zwischen den Patienten mit einzelnen C677T-Genotypen sowie zwischen den Patienten mit und ohne das 677T-Allel nicht signifikant (Chi²-Test bzw. exakter Test nach Fisher, $p>0,05$). Auch hinsichtlich schwerer GI-Symptome zeigte sich kein Unterschied zwischen den Genotypen (Tabelle 33).

Tabelle 33: Schwere GI-Symptome unter Patienten mit einzelnen C677T-Genotypen

	Leichte GI-Symptome ¹	Schwere GI-Symptome ²
677 CC (n=57)	26	31
677 CT (n=70)	39	31
677 TT (n=19)	12	7

¹Leichte Übelkeit mit/ohne Erbrechen, tolerabel mit/ohne Antiemetika. ²Ausgeprägte oder anhaltende Übelkeit mit/ohne Erbrechen (>1-mal) über ≥ 24 Stunden nach MTX-Einnahme, trotz der Antiemetika.

Chi²-Test bzw. exakter Test nach Fisher, $p>0,05$.

In der Subgruppe von Patienten, die keine prophylaktische Supplementierung mit Folsäure erhielten, konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen einzelnen Genotypen nachgewiesen werden (exakter Test nach Fisher, $p>0,05$). Unter Folatsupplementierung kam es bei Patienten mit dem 677CC- sowie mit dem 677CT-Genotyp hingegen signifikant häufiger zu GI-Nebenwirkungen als bei 677TT-Patienten (exakter Test nach Fisher, $p=0,031$ bzw. $p=0,008$). Der Unterschied zwischen den 677CC- und 677CT-Patienten war statistisch nicht signifikant (exakter Test nach Fisher, $p>>0,05$). Die prophylaktische

Supplementierung mit Folsäure führte zu einer deutlichen Reduzierung der GI-Nebenwirkungshäufigkeit bei Patienten mit dem 677TT-Genotyp (17/26 Patienten ohne vs. 0/7 Patienten mit Folatsupplementierung; exakter Test nach Fisher, $p=0,003$), zeigte jedoch keine positive Wirkung bei Patienten mit dem 677CC- bzw. 677CT-Genotyp (exakter Test nach Fisher, $p>0,05$).

Tabelle 34: GI-Nebenwirkungen mit bzw. ohne Folatsupplementierung unter Patienten mit einzelnen C677T-Genotypen

	677CC (n=121)			677CT (n=109)			677TT (n=33)		
	GI-Nebenwirkungen ^{&}			GI-Nebenwirkungen ^{&}			GI-Nebenwirkungen ^{&}		
	Ja	Nein	p [#]	Ja	Nein	p [#]	Ja	Nein	p [#]
Ohne Folsäure	39 (47,6)	43 (52,4)	1,00	46 (59,0)	32 (41,0)	1,00	17 (65,4)	9 (34,6)	0,003
Mit Folsäure*	19 (48,7)	20 (51,3)		19 (61,3)	12 (38,7)		0	7 (100)	

[&]Anzahl der Patienten (%). *Prophylaktische Supplementierung mit Folsäure seit MTX-Therapiebeginn. [#]Exakter Test nach Fisher.

Transaminasenerhöhung

Der C677T-Polymorphismus zeigte keinen Zusammenhang mit einer Transaminasenerhöhung unter MTX (χ^2 -Test, $p>0,05$). Auch hinsichtlich einer $\geq 2,5$ -fachen Transaminasenerhöhung ergab sich kein Häufigkeitsunterschied sowohl zwischen einzelnen C677T-Genotypen als auch zwischen Patienten mit und ohne 677T-Allel (Tabelle 35).

Tabelle 35: Transaminasenerhöhung unter einzelnen C677T-Genotypen

	Transaminasenerhöhung (n=111)	
	<2.5x erhöht ^{&}	$\geq 2.5x$ erhöht ^{&}
677 CC (n=48)	39	9
677 CT (n=50)	41	9
677 TT (n=13)	11	2

[&]Referenzwerte: altersspezifische oberste Normgrenze.

χ^2 -Test bzw. exakter Test nach Fisher, $p>>0,05$.

Hinsichtlich der Folatsupplementierung zeigte sich kein Häufigkeitsunterschied zwischen den Genotypen sowohl in der Subgruppe von Patienten ohne prophylaktische Folatsupplementierung, als auch bei Patienten, die gleichzeitig Folsäure erhielten (χ^2 -Test bzw. exakter Test nach Fisher, $p>>0,05$). Trotzdem zeigte sich bei 677T-Allelträgern (677CT- und 677TT-Genotypen) eine statistisch signifikante Reduzierung der Häufigkeit einer Transaminasenerhöhung bei gleichzeitiger Folatsupplementierung (54/104 Patienten ohne bzw. 8/38 Patienten mit Folatsupplementierung hatten ein Anstieg der Transaminasen unter MTX; exakter Test nach Fisher, $p=0,01$); OR = 4,05 [95%CI 1,70-9,66]. Ohne Folatsupplementierung kam es bei 42 von 78 Patienten mit dem 677CT-Genotyp sowie bei 12 von 26 Patienten mit dem 677TT-Genotyp zu einem Anstieg der Transaminasen, im Gegensatz zu 7/31 Patienten mit dem 677CT- bzw. 1/7 Patienten mit dem 677TT-Genotyp, die prophylaktisch Folsäure erhielten. Wenn die beiden Genotypen einzeln analysiert wurden, war der Unterschied nur in der Subgruppe von Patienten mit dem 677CT-Genotyp statistisch signifikant (exakter Test nach Fisher, $p=0,005$ für 677CT-Genotyp bzw. $p>0,05$ für 677TT-Genotyp). Bei Patienten mit dem 677CC-Genotyp unterschied sich die Häufigkeit der Transaminasenerhöhung mit und ohne Folatsupplementierung nicht signifikant (28% mit bzw. 45% ohne Folsäure; exakter Test nach Fisher, $p>0,05$).

Tabelle 36: Transaminasenerhöhung mit bzw. ohne Folatsupplementierung unter einzelnen C677T-Genotypen

	677CC (n=121)			677CT (n=109) [§]			677TT (n=33)		
	Transaminasenerhöhung ^{&}			Transaminasenerhöhung ^{&}			Transaminasenerhöhung ^{&}		
	Ja	Nein	p [#]	Ja	Nein	p [#]	Ja	Nein	p [#]
Ohne Folsäure	37 (45,1)	45 (54,9)	0,1	42 (53,8)	36 (46,2)	0,005	12 (46,2)	14 (53,8)	0,2
Mit Folsäure*	11 (28,2)	28 (71,8)		7 (22,6)	24 (77,4)		1 (14,3)	6 (85,7)	

[&]Anzahl der Patienten (%). *Prophylaktische Supplementierung mit Folsäure seit MTX-Therapiebeginn.

[#]Exakter Test nach Fisher, p-Werte $>0,05$ = statistisch nicht signifikant. [§]OR=4,0 [95%CI 1,54-10,37].

Orale Mukositis

Orale Aphthen traten bei insgesamt 15 Patienten auf, bei 2 Patienten wurden gleichzeitig Ulzerationen im Genitalbereich beobachtet. Dabei war das Auftreten einer oralen Mukositis bei Patienten mit dem 677TT-Genotyp im Durchschnitt 5-fach wahrscheinlicher als bei 677CC-Patienten (OR= 4,95 [95%CI 1,25-19,6]). Der Unterschied zwischen den Patienten mit dem 677CC- und dem 677CT-Genotyp war statistisch nicht signifikant (exakter Test nach Fisher, $p > 0,05$).

Tabelle 37: MTX-induzierte Mukositis unter einzelnen C677T-Genotypen

	Orale Mukositis unter MTX	
	Ja	Nein
677 CC* (n=123)	4	119
677 CT (n=117)	6	111
677 TT* (n=35)	5	30

Chi²-Test bzw. exakter Test nach Fisher. p-Werte $> 0,05$ = statistisch nicht signifikant.

*677TT vs. 677CC: exakter Test nach Fisher, $p=0,026$; OR=4,95 [95%CI 1,25-19,6]. 677CC vs. 677T-Allelträger: exakter Test nach Fisher, $p > 0,05$.

Die prophylaktische Folatsupplementierung mit Folsäure zeigte keinen Zusammenhang mit dem Auftreten einer Mukositis bei allen C677T-Genotypen (exakter Test nach Fisher, $p > 0,05$).

Tabelle 38: Auftreten einer Mukositis unter einzelnen C677T-Genotypen mit bzw. ohne Folatsupplementierung

	677CC (n=121)			677CT (n=109)			677TT (n=33)		
	Mukositis ^{&}			Mukositis ^{&}			Mukositis ^{&}		
	Ja	Nein	p [#]	Ja	Nein	p [#]	Ja	Nein	p [#]
Ohne Folsäure	2 (2,4)	80 (97,6)	0,59	4 (5,1)	74 (94,9)	1,00	4 (15,4)	22 (84,6)	1,00
Mit Folsäure*	2 (5,1)	37 (94,9)		2 (6,5)	29 (93,5)		1 (14,3)	6 (85,7)	

[&]Anzahl der Patienten (%). *Prophylaktische Supplementierung mit Folsäure seit MTX-Therapiebeginn.

[#]Exakter Test nach Fisher, p-Werte $> 0,05$ = statistisch nicht signifikant.

3.3.2. MTHFR A1298C-Polymorphismus und MTX-assozierte Toxizität

Ein Zusammenhang zwischen dem A1298C-SNP und dem Auftreten von MTX-assozierten Nebenwirkungen wurde bei 276 Patienten untersucht. Bei 124 von insgesamt 142 Patienten mit dem 1298AA-, 74 von 92 Patienten mit dem 1298AC- und 30 von 42 Patienten mit dem 1298CC-Genotyp traten Nebenwirkungen unter MTX auf (Tabelle 39, Abbildung 9). Es zeigte sich eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Polymorphismus und der MTX-Toxizität (exakter Test nach Fisher, $p=0,03$). Bei Patienten mit dem 1298AA-Genotyp traten die Nebenwirkungen signifikant häufiger auf, als bei Patienten mit dem 1298CC-Genotyp (87% vs. 71%); OR = 2,76 [95%CI 1,2 - 6,3].

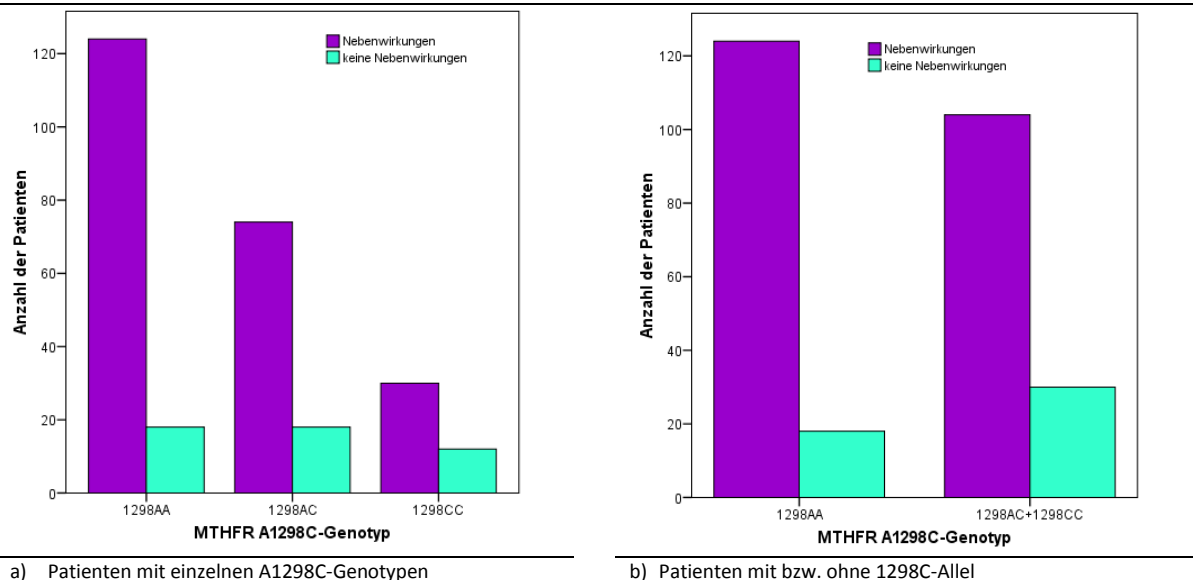
Tabelle 39: MTX-Verträglichkeit bei Patienten mit einzelnen A1298C-Genotypen (n=276)

	Nebenwirkungen unter MTX	
	Ja (n=228)	Nein (n=48)
1298 AA* (n=142)	124	18
1298 AC (n=92)	74	18
1298 CC* (n=42)	30	12

Chi²-Test bzw. exakter Test nach Fisher, p-Werte $> 0,05$ = statistisch nicht signifikant.

*Für den Vergleich „1298AA vs. 1298CC“: exakter Test nach Fisher, $p=0,03$. OR=2,76 [95%CI 1,2-6,3]. Für „1298AA vs. 1298C-Allelträger“: exakter Test nach Fisher, $p=0,04$; OR =1,99 [95%CI 1,05-3,77].

Abb. 9. MTHFR A1298C-Polymorphismus und MTX-Toxizität



Auch für den A1298C-Polymorphismus wurde untersucht, ob die Folatsupplementierung die MTX-Verträglichkeit bei Patienten mit einzelnen Genotypen unterschiedlich beeinflusst. Wie bereits in *Tabelle 9* gezeigt wurde, unterschied sich die Häufigkeit der prophylaktischen Folatsupplementierung zwischen den Genotypgruppen nicht signifikant.

Unter Patienten, die keine prophylaktische Supplementierung mit Folsäure erhielten (*Tabelle 40*), traten Nebenwirkungen bei 1298AA-Patienten häufiger auf, als bei 1298C-Allelträgern (94% vs. 75,6%), OR =4,9 [95%CI 1,9 - 12,8]. Der Unterschied war statistisch signifikant (exakter Test nach Fisher, $p=0,001$).

Tabelle 40: MTX-assoziierte Nebenwirkungen ohne Folatsupplementierung (n=187)

	Nebenwirkungen unter MTX	
	Ja (n=159)	Nein (n=28)
1298 AA (n=97)	91	6
1298 AC (n=59)	46	13
1298 CC (n=31)	22	9

Exakter Test nach Fisher, p -Werte $>0,05$ = statistisch nicht signifikant.
Für den Vergleich „1298AA vs. 1298CC“: $p=0,002$; OR=6,2 [95%CI 2,0-19,3]. 1298AA vs. 1298AC: $p=0,005$; OR=4,29 [95%CI 1,53-12,0]. 1298AA vs. 1298C-Allelträger: $p=0,001$; OR=4,9 [95%CI 1,9-12,8].

Unter Patienten, die eine prophylaktische Folatsupplementierung erhielten (*Tabelle 41*), ergab sich hingegen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit von MTX-assoziierten Nebenwirkungen sowohl zwischen einzelnen A1298C-Genotypen, als auch zwischen den Patienten mit und ohne das 1298C-Allel (χ^2 -Test bzw. exakter Test nach Fisher, $p>0,05$).

Tabelle 41: MTX-assoziierte Nebenwirkungen unter Folatsupplementierung (n=77)

	Nebenwirkungen unter MTX	
	Ja (n=58)	Nein (n=19)
1298 AA (n=36)	24	12
1298 AC (n=30)	26	4
1298 CC (n=11)	8	3

χ^2 -Test bzw. exakter Test nach Fisher, $p>0,05$.

Unter Patienten mit dem 1298AA-Genotyp ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang der Folsäuresupplementierung mit dem Auftreten von MTX-assoziierten Nebenwirkungen (exakter Test nach Fisher, $p < 0,001$). Bei 91 von 97 Patienten, die keine Supplementierung mit Folsäure erhielten, traten Nebenwirkungen unter MTX auf, im Gegensatz zu 24 von 36 Patienten, die seit MTX-Therapiebeginn Folsäure bekamen (94% vs. 67%; OR=7,6 [95%CI 2,6-22,3]). Unter Patienten mit dem 1298C-Allel zeigte sich hingegen kein wesentlicher Unterschied mit und ohne Folsäuresupplementierung (76% vs. 83%; exakter Test nach Fisher, $p > 0,05$).

Tabelle 42: MTX-Verträglichkeit und Folsäuresupplementierung unter Patienten mit einzelnen A1298C-Genotypen

	1298AA (n=133) [§]			1298AC (n=89)			1298CC (n=42)		
	Nebenwirkungen unter MTX ^{&}			Nebenwirkungen unter MTX ^{&}			Nebenwirkungen unter MTX ^{&}		
	Ja	Nein	p [#]	Ja	Nein	p [#]	Ja	Nein	p [#]
Ohne Folsäure	91 (93,8)	6 (6,2)	<0,001	46 (78,0)	13 (22,0)	0,40	22 (71,0)	9 (29,0)	1,00
Mit Folsäure*	24 (66,7)	12 (33,3)		26 (86,7)	4 (13,3)		8 (72,7)	3 (27,3)	

[&]Anzahl der Patienten (%). *Prophylaktische Supplementierung mit Folsäure seit MTX-Therapiebeginn.

[#]Exakter Test nach Fisher, p-Werte >0,05 = statistisch nicht signifikant. [§]OR=7,58 [95%CI 2,58-22,29].

Tabelle 43 zeigt die Häufigkeitsverteilung einzelner organspezifischer Nebenwirkungen unter Patienten mit 1298AA-, 1298AC- bzw. 1298CC-Genotyp. Ein statistisch gesicherter Zusammenhang konnte nur mit dem Auftreten von GI-Symptomen nachgewiesen werden (Chi²-Test, $p = 0,014$). Hinsichtlich der übrigen Nebenwirkungen zeigte sich kein statistisch gesicherter Unterschied sowohl zwischen einzelnen A1298C-Genotypen als auch zwischen den Patienten mit und ohne Variant-Allel.

Tabelle 43: Häufigkeitsverteilung der Nebenwirkungen zwischen einzelnen A1298C-Genotypen

	MTHFR A1298C-Genotyp*			p [#]
	AA (n=142)	AC (n=92)	CC (n=42)	
GI-Symptome	88 (62,0)	46 (50,0)	16 (38,1)	0,014 [§]
Transaminasenerhöhung	57 (40,1)	41 (44,6)	14 (33,3)	0,47
Ekelgefühl	40 (28,2)	21 (22,8)	12 (28,6)	0,63
Mukositis	8 (5,6)	5 (5,4)	2 (4,8)	0,98
Neurologische Symptome (Schwindel, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schwächegefühl)	6 (4,2)	3 (3,3)	1 (2,4)	0,83
Gehäufte Infektionen	7 (4,9)	2 (2,2)	1 (2,4)	0,49
Haarausfall	3 (2,1)	2 (2,2)	2 (4,8)	0,61
Leukopenie	6 (4,2)	1 (1,1)	0	0,17
Reizhusten ^{&}	1 (0,7)	0	1 (2,4)	-
Allergisches Exanthem ^{&}	1 (0,7)	3 (3,3)	0	-
Anämie ^{&}	1 (0,7)	0	0	-
Proteinurie ^{&}	2 (1,4)	0	0	-
Hämaturie ^{&}	1 (0,7)	1 (1,1)	0	-
Warzenbildung ^{&}	1 (0,7)	1 (1,1)	0	-
Juckreiz ^{&}	0	0	1 (2,4)	-
Nodulosis ^{&}	0	0	1 (2,4)	-

*n=Patientenanzahl (% von Anzahl der Patienten mit dem jeweiligen Genotyp).

[#]Chi²-Test bzw. exakter Test nach Fisher. p-Werte >0,05 = statistisch nicht signifikant.

[§]Für 1298AA vs. 1298C-Allelträger: exakter Test nach Fisher, $p = 0,011$; OR=1,9 [95%CI 1,2-3,1].

1298AA vs. 1298CC: exakter Test nach Fisher, $p = 0,008$; OR=2,65 [95%CI 1,30-5,38]. 1298AA vs. 1298AC: $p > 0,05$.

[&]p-Werte nicht kalkuliert wegen der geringen Patientenzahl (<7).

GI-Symptome

Unter MTX traten GI-Nebenwirkungen bei Patienten mit dem 1298AA-Genotyp signifikant häufiger auf als bei 1298CC-Patienten (62% vs. 38%; exakter Test nach Fisher, $p = 0,008$); OR = 2,65 [95%CI 1,30-5,38].

Wenn die Folatsupplementierung mit in Betracht gezogen wurde, zeigte sich der Unterschied zwischen den 1298AA-Patienten und den 1298C-Allelträgern nur für die Subgruppe der Patienten, die keine Folatsupplementierung erhielten, als statistisch signifikant (Tabelle 44).

Tabelle 44: GI-Nebenwirkungen bei einzelnen A1298C-Genotypen mit und ohne Folatsupplementierung

	Ohne Folsäure (n=187) ¹		Mit Folsäure* (n=77) ²	
	GI-Nebenwirkungen unter MTX		GI-Nebenwirkungen unter MTX	
	Ja (n=103)	Nein (n=84)	Ja (n=38)	Nein (n=39)
1298 AA (n=133)	65	32	16	20
1298 AC (n=89)	25	34	19	11
1298 CC (n=42)	13	18	3	8

*Prophylaktische Supplementierung mit Folsäure seit MTX-Therapiebeginn.

Chi²-Test bzw. exakter Test nach Fisher, p-Werte >0,05 = statistisch nicht signifikant.

¹ Für den Vergleich „1298AA vs. 1298C-Allelträger“: exakter Test nach Fisher, p=0,001; OR=2,78 [95%CI 1,53-5,04]. Für „1298AA vs. 1298CC“: exakter Test nach Fisher, p=0,019; OR=2,8 [95%CI 1,2-6,4]. ² Für den Vergleich „1298AA vs. 1298C-Allelträger“ sowie für „1298AA vs. 1298CC“: exakter Test nach Fisher, p>>0,05.

Unter Patienten mit dem 1298AA-Genotyp führte die Folatsupplementierung zu einer deutlichen Reduzierung der GI-Nebenwirkungshäufigkeit (67% ohne bzw. 44,4% mit Folatsupplementierung; OR=2,54 [95%CI 1,16-5,55]). Dieser Unterschied war statistisch signifikant (exakter Test nach Fisher, p=0,03). Bei 1298C-Allelträgern zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Folatsupplementierung und dem Auftreten von GI-Nebenwirkungen (exakter Test nach Fisher, p>0,05).

Tabelle 45: GI-Nebenwirkungen und Folatsupplementierung unter Patienten mit einzelnen A1298C-Genotypen

	1298AA (n=133) [§]			1298AC (n=89)			1298CC (n=42)		
	GI-Nebenwirkungen ^{&}			GI-Nebenwirkungen ^{&}			GI-Nebenwirkungen ^{&}		
	Ja	Nein	p [#]	Ja	Nein	p [#]	Ja	Nein	p [#]
Ohne Folsäure	65 (67)	32 (33)	0,03	25 (42,4)	34 (57,6)		13 (41,9)	18 (58,1)	
Mit Folsäure*	16 (44,4)	20 (55,6)		19 (63,3)	11 (36,7)	0,075	3 (27,3)	8 (72,7)	0,49

[&]Anzahl der Patienten (%). *Prophylaktische Supplementierung mit Folsäure seit MTX-Therapiebeginn.

[#]Exakter Test nach Fischer. [§]OR=2,54, 95%CI 1,16-5,55.

Die Häufigkeit von schweren GI-Symptomen zeigte keinen Unterschied sowohl zwischen einzelnen A1298C-Genotypen, als auch zwischen Patienten mit und ohne 1298C-Allel (Chi²-Test, p>0,05).

Tabelle 46: Schwere GI-Symptome unter Patienten mit einzelnen A1298C-Genotypen

	GI-Nebenwirkungen	
	Leichte GI-Symptome ¹	Schwere GI-Symptome ²
1298 AA (n=86)	47	39
1298 AC (n=45)	24	21
1298 CC (n=16)	7	9

¹Leichte Übelkeit mit/ohne Erbrechen, tolerabel mit/ohne Antiemetika.

²Ausgeprägte oder anhaltende Übelkeit mit/ohne Erbrechen (>1-mal) über ≥ 24 Stunden nach MTX-Einnahme, trotz der Antiemetika.

Chi²-Test bzw. exakter Test nach Fisher, p>>0,05.

Transaminasenerhöhung

Es ergab sich kein Zusammenhang zwischen der MTX-assoziierten Transaminasenerhöhung und dem A1298C-Polymorphismus. Auch hinsichtlich einer ≥2,5-fachen Transaminasenerhöhung unter MTX-Therapie zeigte sich kein Unterschied sowohl zwischen einzelnen A1298C-Genotypen als auch zwischen den Patienten mit bzw. ohne 1298C-Allel.

Tabelle 47: Transaminasenerhöhung unter einzelnen C677T-Genotypen

	Transaminasenerhöhung (n=112)	
	<2.5x erhöht ^{&}	≥2.5x erhöht ^{&}
1298 AA (n=57)	47	10
1298 AC (n=41)	32	9
1298 CC (n=14)	12	2

[&]Referenzwerte: altersspezifische oberste Normgrenze.

Chi²-Test bzw. exakter Test nach Fisher, p>>0,05.

Hinsichtlich der Folatsupplementierung zeigte sich eine statistisch gesicherte Assoziation zur Transaminasenerhöhung bei Patienten mit 1298AA- und 1298AC-Genotyp, jedoch nicht für den 1298CC-Genotyp. Unter Patienten mit 1298AA-Genotyp kam es zu einem Anstieg der Transaminasen bei 49 von 97 Patienten, die keine Folatsupplementierung erhielten, im Gegensatz zu 7 von 36 Patienten, die gleichzeitig Folsäure bekamen (exakter Test nach Fisher, p=0,001). Die Wahrscheinlichkeit einer Transaminasenerhöhung ohne Folsäure war im Durchschnitt 4-fach höher, als die unter Folatsupplementierung (OR = 4,23 [95%CI 1,69-10,57]). Auch unter Patienten mit 1298AC-Genotyp trat ein Transaminasenanstieg ohne Folatsupplementierung signifikant häufiger auf, als wenn die Patienten gleichzeitig Folsäure bekamen (54% vs. 30%; exakter Test nach Fisher, p=0,043). Bei Patienten mit 1298CC-Genotyp unterschied sich die Häufigkeit mit und ohne Folatsupplementierung nicht signifikant (exakter Test nach Fisher, p>0,05).

Tabelle 48: Transaminasenerhöhung mit und ohne Folatsupplementierung unter einzelnen A1298C-Genotypen

	1298AA (n=133) ¹			1298AC (n=89) ²			1298CC (n=42)		
	Transaminasenerhöhung ^{&}			Transaminasenerhöhung ^{&}			Transaminasenerhöhung ^{&}		
	Ja	Nein	p [#]	Ja	Nein	p [#]	Ja	Nein	p [#]
Ohne Folsäure	49 (50,5)	48 (49,5)	0,001	32 (54,2)	27 (45,8)	0,043	11 (35,5)	20 (64,5)	0,70
Mit Folsäure*	7 (19,4)	29 (80,6)		9 (30)	21 (70)		3 (27,3)	8 (72,7)	

[&]Anzahl der Patienten (%). *Prophylaktische Supplementierung mit Folsäure seit MTX-Therapiebeginn.

[#]Exakter Test nach Fischer. ¹OR=4,23 [95%CI 1,69-10,57]. ²OR=2,77 [95%CI 1,09-7,04].

3.3.3. MTX-Verträglichkeit: Regressionsanalyse der Einflussvariablen

Eine logistische Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um ein prädiktives Modell zu konstruieren, mit dem das Auftreten oder Nichtauftreten von MTX-assoziierten Nebenwirkungen vorhergesagt werden konnte, und um die Quotenverhältnisse jeder unabhängigen Einflussvariable im Modell zu schätzen. Wenn alle untersuchten Variablen zusammen im Modell analysiert wurden, zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang des Modells zur MTX-Toxizität (Chi²=18,4; df=9, n=246, p=0,031). Zwischen 7,2% und 11,8% der Nebenwirkungswahrscheinlichkeit konnte durch das Modell erklärt werden (Cox & Snell R²= 0,072; Nagelkerkes R²=0,118; 2-Log-Likelihood = 212,67). Die MTX-Verträglichkeit konnte bei insgesamt 82,5% der Patienten korrekt vorhergesagt werden, dabei schien das Modell vor allem für die Vorhersage des Auftretens von Nebenwirkungen sehr gut geeignet zu sein (99,5% der Patienten wurden korrekt klassifiziert). Für die Vorhersage des Nichtauftretens von MTX-assoziierten Nebenwirkungen war das Modell eher wertlos (nur 4,6% der Patienten wurden richtig klassifiziert). Innerhalb des Modells ergab sich ein Zusammenhang mit der MTX-Verträglichkeit lediglich für den A1298C-Genotyp. Auch das „Alter bei MTX-Therapiebeginn“ zeigte im Modell keine Assoziation zur MTX-Verträglichkeit.

Tabelle 49: Logistische Regressionsanalyse: MTX-Nebenwirkungen

	B ¹	SE ²	p ³	OR ⁴	95% CI ⁵	
Geschlecht	-0,368	0,360	0,308	0,692	0,342	1,403
Alter bei MTX-Therapiebeginn	-0,074	0,042	0,077	0,929	0,856	1,008
MTHFR-677C>T [§]	0,586	0,322	0,069	1,797	0,956	3,379
MTHFR-1298A>C [§]	0,868	0,294	0,003	2,382	1,339	4,237
MTX-Dosis	-0,035	0,080	0,660	0,966	0,826	1,129
Andere DMARDs	0,564	0,651	0,386	1,758	0,491	6,297
Steroide	0,526	0,475	0,268	1,692	0,668	4,289
NSAR	-1,969	1,088	0,070	0,140	0,017	1,178
Folatsupplementierung*	0,485	0,387	0,210	1,624	0,761	3,467
Konstante	-1,257	1,827	0,491	0,284	-	-

[§]MTHFR-677C>T: der 677CC-Genotyp wurde mit „1“, der 677CT-Genotyp mit „2“ bzw. der 677TT-Genotyp mit „3“ kodiert. MTHFR-1298A>C-Genotyp: der 1298AA-Genotyp wurde mit „1“, der 1298AC-Genotyp mit „2“ bzw. der 1298CC-Genotyp mit „3“ kodiert. 677T-Allel bzw. 1298C-Allel: im Modell nicht signifikant (p>>0,05)

¹Regressionskoeffizient-B; ²Standardfehler; ³Signifikanz; ⁴Quotenverhältnis; ⁵Konfidenzintervall

Das Auftreten der Nebenwirkungen wurde mit „0“ bzw. das Nichtauftreten mit „1“ kodiert.

Darüber hinaus wurden die MTX-assoziierten GI-Nebenwirkungen und Transaminasenerhöhung separat analysiert.

Hinsichtlich der GI-Nebenwirkungen ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem Alter, MTX-Dosis, A1298C-Polymorphismus sowie mit dem Vorhandensein einer Begleittherapie mit Steroiden. Durch das Modell konnte die GI-Verträglichkeit der MTX-Therapie bei insgesamt 65,9% der Patienten korrekt vorhergesagt werden (von diesen bei 72,5% der Patienten mit und bei 58,3% der Patienten ohne GI-Nebenwirkungen). Das Modell war mit der Wahrscheinlichkeit der GI-Nebenwirkungen statistisch signifikant assoziiert (Chi²=27,7; df=9; n=246; p=0,001) und konnte zwischen 10,7% und 14,2% der Varianz der GI-Nebenwirkungswahrscheinlichkeit erklären (Cox & Snell R² = 0,107; Nagelkerkes R²=0,142; 2-Log-Likelihood = 312,28).

Tabelle 50: Logistische Regressionsanalyse: GI-Nebenwirkungen unter MTX

	B ¹	SE ²	p ³	OR ⁴	95% CI ⁵	
Geschlecht	-0,374	0,282	0,184	0,688	0,396	1,195
Alter bei MTX-Therapiebeginn	-0,112	0,033	0,001	0,894	0,838	0,955
MTHFR-677C>T [§]	0,216	0,232	0,351	1,241	0,788	1,954
MTHFR-1298A>C [§]	0,572	0,216	0,008	1,772	1,160	2,708
MTX-Dosis	-0,141	0,062	0,023	0,868	0,769	0,981
Andere DMARDs	0,303	0,570	0,594	1,354	0,443	4,138
Steroide	0,957	0,430	0,026	2,603	1,121	6,048
NSAR	-1,564	1,181	0,185	0,209	0,021	2,119
Folatsupplementierung*	0,340	0,309	0,270	1,405	0,768	2,573
Konstante	2,248	1,633	0,169	9,471	-	-

[§]677T-Allel bzw. 1298C-Allel: im Modell nicht signifikant (p>>0,05)

¹Regressionskoeffizient-B; ²Standardfehler; ³Signifikanz; ⁴Quotenverhältnis; ⁵Konfidenzintervall

Das Auftreten der GI-Nebenwirkungen mit „0“ bzw. das Nichtauftreten mit „1“ kodiert.

Hinsichtlich der MTX-assoziierten Transaminasenerhöhung konnte ein statistisch gesicherter Zusammenhang mit dem Alter sowie mit dem Vorhandensein einer prophylaktischen Folatsupplementierung nachgewiesen werden. Die beiden MTHFR-Polymorphismen zeigten keine Assoziation mit der Transaminasenerhöhung. Das Modell zeigte sich als statistisch signifikant (Chi²=22,83; df=9; n=246; p=0,007), zwischen 8,9% und 11,9% der Varianz der MTX-Verträglichkeit

konnten durch das Modell geklärt werden (Cox & Snell $R^2 = 0,089$; Nagelkerkes $R^2 = 0,119$). Wenn das Modell angewendet wurde, konnten 62,6% der Patienten korrekt klassifiziert werden, von diesen 44,7% der Patienten mit bzw. 75,5% der Patienten ohne MTX-assoziierte Transaminasenerhöhung.

Tabelle 51: Logistische Regressionsanalyse: Transaminasenerhöhung unter MTX

	B ¹	SE ²	p ³	OR ⁴	95% CI ⁵	
Geschlecht	-0,335	0,282	0,235	0,715	0,411	1,243
Alter bei MTX-Therapiebeginn	0,092	0,033	0,005	1,096	1,028	1,169
MTHFR-677C>T ⁵	0,041	0,227	0,856	1,042	0,668	1,626
MTHFR-1298A>C ⁵	0,145	0,213	0,497	1,156	0,761	1,755
MTX-Dosis	0,036	0,061	0,558	1,036	0,920	1,168
Andere DMARDs	0,223	0,603	0,711	1,250	0,383	4,077
Steroide	0,506	0,434	0,243	1,659	0,709	3,882
NSAR	-0,822	1,212	0,498	0,440	0,041	4,726
Folatsupplementierung*	0,951	0,327	0,004	2,590	1,364	4,916
Konstante	-0,699	1,644	0,671	0,497	-	-

⁵677T-Allel bzw. 1298C-Allel: im Modell nicht signifikant ($p > 0,05$)

¹Regressionskoeffizient-B; ²Standardfehler; ³Signifikanz; ⁴Quotenverhältnis; ⁵Konfidenzintervall
Das Auftreten der GI-Nebenwirkungen mit „0“ bzw. das Nichtauftreten mit „1“ kodiert.

4. Diskussion

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der C677T und A1298C MTHFR-Genpolymorphismen hinsichtlich der Wirksamkeit bzw. Verträglichkeit der MTX-Therapie bei Patienten mit JIA. Zu dieser Thematik gibt es bislang wenig Vergleichsliteratur. Die einzige Studie bei Kindern mit JIA wurde von Schmeling et al. (2005) veröffentlicht. Darüber hinaus bietet sich die Möglichkeit die vorliegenden Ergebnisse mit Daten der Untersuchungen bei RA-Patienten zu vergleichen.

Die Genotypverteilung des C677T-Polymorphismus im untersuchten Patientenkollektiv zeigte keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die Frequenz des 677T-Allels und des 677TT-Genotyps betrug 0,34 bzw. 0,13. Es fand sich kein Unterschied in der Allel- bzw. Genotypverteilung zwischen JIA-Patienten dieser Untersuchung und den bereits veröffentlichten Daten bei gesunden Individuen aus Deutschland.

Bezüglich des A1298C-Polymorphismus lag die Häufigkeit des 1298C-Allels bzw. des 1298CC-Genotyps bei 0,32 bzw. 0,15. Es zeigte sich eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, jedoch fand sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Allel- bzw. Genotypfrequenz zwischen JIA-Patienten und historisch gesunden Kontrollen.

Die Genotypkombinationen 677CT/1298CC, 677TT/1298AC und 677TT/1298CC sind nicht aufgetreten. 18% der Patienten erwiesen sich als kombiniert heterozygot (677CT/1298AC).

In Bezug auf die untersuchten Basisparameter wie die Diagnose- bzw. Geschlechtsverteilung, das Alter, Dosierung von MTX, die Krankheitsaktivität bei MTX-Therapiebeginn, sowie das Vorhandensein der Begleitmedikamente wie andere DMARDs und/oder Biologika, Steroide und NSAR, ergab sich kein signifikanter Unterschied sowohl zwischen den Patienten mit dem 677CC-, 677CT- bzw. 677TT-Genotyp, als auch zwischen den Patienten mit dem 1298AA-, 1298AC- bzw. 1298CC-Genotyp. Somit waren die Gruppen miteinander vergleichbar.

4.1. Bewertung der Ergebnisse: MTX-Verträglichkeit

Bei 228 von 277 Patienten (82,3%) wurden MTX-assoziierte Nebenwirkungen beobachtet. Schmeling et al. (2005) berichteten eine deutlich niedrigere Häufigkeit von Nebenwirkungen unter MTX-Therapie (44,8%) bei insgesamt 58 JIA-Patienten. An Nebenwirkungen wurden in der Studie von Schmeling et al. (2005) GI-Symptome (bei 34,5% der Patienten), ein Anstieg der Transaminasen mindestens auf das doppelte des Normalwertes (bei 32,8% der Patienten) und ein Haarausfall (bei 5,2% der Patienten) beobachtet. Der Häufigkeitsunterschied könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass das Nebenwirkungsprofil in unserem Patientenkollektiv deutlich breiter war, außerdem wurden auch die Patienten mit einer Transaminasenerhöhung um <2-fach über die altersspezifische Normgrenze (n=40) in die Analyse eingeschlossen.

An untersuchten Parametern ergab sich eine signifikante Assoziation zur MTX-Verträglichkeit lediglich für das Alter bei MTX-Behandlungsbeginn. Die Patienten, die Nebenwirkungen unter MTX-Therapie erlitten, waren im Durchschnitt um 1,1 Jahre älter als die ohne MTX-Nebenwirkungen (Median: 9,0 Jahre vs. 5,0 Jahre). In der Untersuchung von Haagsma et al. (1999) konnte ein Zusammenhang zwischen einer Hyperhomozysteinämie und dem Auftreten von Nebenwirkungen unter MTX-Therapie bei Erwachsenen mit einer RA gezeigt werden. Schmeling et al. (2005) fanden keine Assoziation einer erhöhten Homozysteinkonzentration mit MTX-Unverträglichkeit bei JIA-Patienten, der Ergebnis ist jedoch aufgrund der kleinen Fallzahl nur eingeschränkt zu werten. Die Untersuchungen bei gesunden Kindern zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Homozystein- bzw. Folat-Serumspiegel (De Laet C, 1999; Must A, 2003; Van Beynum IM, 2005). Die

Homozysteinkonzentrationen waren bei jüngeren Kindern am niedrigsten mit einer altersabhängigen Tendenz zur Erhöhung. Nach der Pubertät waren die Homozysteinkonzentrationen bei Jungen im Durchschnitt höher als bei Mädchen, im jüngeren Alter war die Geschlechtsverteilung hingegen ausgeglichen. Der vom Alter abhängige Anstieg der Homozystein-Serumkonzentration könnte zum einen auf die erhöhte Körpermuskelmasse und den veränderten Hormonstatus, zum anderen auf die tendenziell abnehmende Folataufnahme mit der Nahrung zurückzuführen sein. Eventuell können die altersbedingt höheren Homozystein-Serumspiegel zu MTX-assoziierten Nebenwirkungen prädisponieren. Dies könnte eine Erklärung für die beobachtete Assoziation des Alters mit der MTX-Unverträglichkeit sein.

Es ergab sich kein Zusammenhang zwischen Folatsupplementierung und MTX-Toxizität. Ohne Folatsupplementierung traten MTX-Nebenwirkungen in den ersten 3 Therapiemonaten jedoch häufiger auf, als wenn Folsäure von MTX-Therapiebeginn an supplementiert wurde.

MTX-Verträglichkeit und C677T-Polymorphismus

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen dem C677T-Polymorphismus und dem Auftreten von MTX-Nebenwirkungen gezeigt werden. Ohne Folatsupplementierung ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Nebenwirkungshäufigkeit zwischen den Genotyp-Gruppen. Die Folatsupplementierung führte zu einer deutlichen Reduzierung der Häufigkeit von Nebenwirkungen bei Patienten mit 677TT-Genotyp (von 92% auf 43%); OR = 16 [95%CI 2,0 - 127,9]. Unter Patienten mit 677CC- bzw. 677CT-Genotyp zeigte sich kein wesentlicher Unterschied mit und ohne Folsäure.

Die bislang veröffentlichten Untersuchungen berichteten widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich einer Assoziation zwischen C677T-Polymorphismus und einer MTX-Unverträglichkeit.

Schmeling et al. (2005) fanden einen Zusammenhang des 677T-Allels mit dem Auftreten von MTX-Nebenwirkungen bei JIA-Patienten (n=58). Die Nebenwirkungen traten bei 9/29 Patienten (31%) mit CC-Genotyp, bei 17/26 Patienten (65%) mit 677CT-Genotyp, jedoch bei keinem von 3 Patienten mit 677TT-Genotyp auf. Die Patienten in dieser Untersuchung erhielten keine Folatsupplementierung.

Urano et al. (2002) fanden einen Zusammenhang zwischen dem 677T-Allel und dem gehäuftem Auftreten von MTX-Nebenwirkungen bei RA-Patienten (n=106). Auch in dieser Studie erhielten die Patienten keine Supplementierung von Folsäure.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen in Widerspruch zu den Daten von Schmeling et al. (2005) und Urano et al. (2002). In der Subgruppe von Patienten, die keine Folatsupplementierung erhielten, ergab sich keine Assoziation des C677T-Polymorphismus mit der MTX-Nebenwirkungshäufigkeit. In der Untersuchung von Schmeling et al. (2005) zeigte sich zwar ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Nebenwirkungshäufigkeit zwischen Patienten mit und ohne 677T-Allel, dies ist jedoch bei kleiner Fallzahl (u.a. bei 3 Patienten mit dem 677TT-Genotyp) nur eingeschränkt zu werten. Bezüglich der Ergebnisse der Untersuchung von Urano et al. (2002) an Erwachsenen mit einer RA müssen sowohl die möglichen ethnischen Unterschiede zwischen den Studiengruppen (alle Patienten in der Studie von Urano et al. (2002) waren Japaner, in der vorliegenden Arbeit waren ca. 97% der Patienten Kaukasier), als auch die altersabhängigen Unterschiede im Homozystein- bzw. Folatstatus berücksichtigt werden. Wie im *Kapitel 1.5.1.1.* bereits diskutiert, führt der 677C>T-Nukleotidaustausch zu einer Verminderung der enzymatischen Aktivität der MTHFR. Bei Individuen mit dem 677TT-Genotyp kann es hierdurch zur Abnahme der Methylierung von Homozystein zu Methionin mit einem Anstieg der Homozystein-Serumkonzentration kommen, vor allem bei einem gleichzeitigen Folatmangel. MTX beeinflusst den Homozysteinstoffwechsel, indem es einen Mangel an 5-Methyl-THF, dem Kohlenstoffdonor für die Methylierung von Homozystein, induziert. Dies führt zu einer verminderten Methioninsynthese und zur Erhöhung der Homozysteinkonzentration. Die MTX-induzierte Hyperhomozysteinämie stellt dabei einen der Mechanismen der MTX-Toxizität dar. Aufgrund der

vorbestehenden erhöhten Homozysteinkonzentrationen könnte diese Wirkung von MTX bei 677TT-Patienten verstärkt auftreten, hierdurch könnte es vermehrt zu MTX-assoziierten Nebenwirkungen kommen. Bei ausreichendem Folatstatus bzw. bei einer Folataufnahme in der allgemein empfohlenen Tagesdosis kann die Wirkung des 677C>T-Austausches jedoch neutralisiert werden. Andererseits kann bei einer milden MTHFR-Aktivitätsverminderung, die infolge des 677C>T-Polymorphismus entsteht, durch die Erhöhung der intrazellulären 5,10-Methylen-THF-Konzentration die Nukleotidbiosynthese begünstigt werden. Dadurch steigt die DNA-Replikations- bzw. Reparaturkapazität, diese könnte zur Verminderung der antiproliferativen Wirkung von MTX führen.

Wie bereits erwähnt, sind die Homozysteinspiegel bei jüngeren Kindern relativ niedrig und es besteht eine vom Alter abhängige Erhöhung der Homozysteinserumkonzentration, vermutlich aufgrund der zunehmenden Körpermuskelmasse und der abnehmenden Folataufnahme. Die Ergebnisse einer Untersuchung zeigten, dass sich die Homozysteinkonzentrationen zwischen den einzelnen C677T-Genotypen unter <10-Jährigen nicht unterscheiden (Delvin EE, 2000). Unter >10-Jährigen wiesen die Kinder mit dem 677TT-Genotyp hingegen höhere Homozysteinkonzentrationen auf, als diejenigen mit dem 677CC bzw. 677CT-Genotyp, vor allem bei einem unzureichenden Folatstatus (Delvin EE, 2000; Papoutsakis C, 2006). Darüber hinaus scheint der Folatstatus im Kleinkindesalter gut kompensiert zu sein mit einer Tendenz zur Abnahme im Jugendlichen- bzw. Erwachsenenalter, u.a. auch wegen der verminderten Folataufnahme mit der Nahrung (De Laet C, 1999; Delvin EE, 2000; Must A, 2003; van Beynum IM, 2005; Papoutsakis C, 2005). Die vom Alter abhängig niedrigeren Homozysteinkonzentrationen sowie die ausreichende Folataufnahme bei jüngeren Kindern könnten zu einer besseren MTX-Verträglichkeit im Vergleich zu Erwachsenen beitragen.

Unter RA-Patienten, die eine Folatsupplementierung begleitend zu MTX erhielten, fanden die meisten Untersuchungen keinen Zusammenhang zwischen dem C677T-Polymorphismus und dem Auftreten von MTX-Nebenwirkungen (Aggarwal P, 2006; Dervieux T, 2006; Wessels JA, 2006), vermutlich aufgrund der neutralisierten Wirkung der Folsäure auf die genetisch bedingte Verminderung der MTHFR-Enzymaktivität bei 677TT-Individuen. In der Studie von Spelatas et al. (2005) traten MTX-bedingte Nebenwirkungen bei Patienten mit dem 677CC-Genotyp sogar signifikant häufiger auf als bei Patienten mit dem 677T-Allel (67% vs. 33%). Alle Patienten in dieser Studie erhielten eine prophylaktische Folatsupplementierung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in Übereinstimmung mit diesen Daten. In der Subgruppe von Patienten, die Folsäuresupplementierung erhielten, ergab sich kein Unterschied in der Nebenwirkungshäufigkeit zwischen einzelnen C677T-Genotypen. Die Nebenwirkungen traten beim 677CC-Genotyp zwar häufiger auf, als beim 677TT-Genotyp (80% vs. 43%), der Unterschied war jedoch bei kleiner Patientenzahl nicht signifikant.

Hinsichtlich der Art der Nebenwirkungen ergab sich eine Assoziation zwischen dem 677TT-Genotyp und dem Auftreten einer oralen Mukositis unter MTX. Die Patienten mit dem 677TT-Genotyp erlitten signifikant häufiger eine Mukositis unter MTX-Therapie als die mit dem 677CC-Genotyp (14% vs. 3%); OR = 4,95 [95%CI 1,25-19,6]. Das Vorhandensein der Folatsupplementierung zeigte keinen Zusammenhang mit dem Auftreten der Mukositis. In der Arbeit von Ulrich et al. (2001) zeigte sich ebenfalls eine Assoziation des 677TT-Genotyps mit einer MTX-induzierten Mukositis bei Patienten mit chronischer Leukämie, die das MTX im Rahmen einer Knochenmarkstransplantation erhielten (15mg/m² am Tag 1, 10mg/m² am Tag 3, 6 und 11 nach der Transplantation). Die Patienten mit dem 677TT-Genotyp zeigten dabei einen höheren „Oral Mukositis Index“ als die mit dem 677CC-Genotyp.

An MTX-assoziierten Nebenwirkungen wurden bei unseren Studienpatienten am häufigsten GI-Symptome wie Übelkeit, Erbrechen und Bauchschmerzen gemeldet. Unter Patienten ohne Folatsupplementierung ergab sich kein Häufigkeitsunterschied zwischen einzelnen C677T-Genotypen.

Unter Patienten, die vom MTX-Therapieanfang an eine Supplementierung mit Folsäure erhielten, traten die GI-Nebenwirkungen bei 677CC- bzw. 677CT-Patienten jedoch signifikant häufiger auf (49% bzw. 61%) im Vergleich mit den 677TT-Patienten (0/7 Patienten). Bei einer gleichzeitigen Folatsupplementierung reduzierte sich die Häufigkeit von GI-Nebenwirkungen unter Patienten mit dem 677TT-Genotyp signifikant (17/26 Patienten ohne vs. 0/7 Patienten mit Folatsupplementierung). Für den 677CC- bzw. den 677CT-Genotyp ergab sich kein Unterschied mit und ohne Folatsupplementierung.

Die Häufigkeit einer MTX-bedingten Transaminasenerhöhung unterschied sich zwischen einzelnen C677T-Genotypen sowohl mit als auch ohne Folatsupplementierung nicht signifikant. Die Folatsupplementierung führte zur Reduzierung der Häufigkeit einer Transaminasenerhöhung bei allen Genotypen, der Unterschied war jedoch nur für den 677CT-Genotyp statistisch signifikant. Hinsichtlich anderer organspezifischer Nebenwirkungen konnte kein Zusammenhang mit dem C677T-Polymorphismus nachgewiesen werden.

Schmeling et al. (2005) fanden einen statistisch signifikanten Zusammenhang des 677T-Allels mit dem Auftreten einer MTX-bedingten Transaminasenerhöhung. Ein Anstieg der Transaminasen wurde bei 677T-Allelträgern häufiger beobachtet (14/29) als bei 677CC-Patienten (5/29). GI-Nebenwirkungen traten zwar bei Patienten mit dem 677T-Allel häufiger (10/29) auf als bei 677CC-Patienten (4/29), ein statistisch gesicherter Zusammenhang konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache für das Nicht-Replizieren dieser Ergebnisse in unserer Untersuchung kann die unterschiedliche Definition der „MTX-assoziierten Transaminasenerhöhung“ sein. Van Ede et al. (2001) fanden bei RA-Patienten ebenfalls keinen Zusammenhang des 677T-Allels mit einem Transaminasenanstieg, es ergab sich jedoch eine Assoziation mit erhöhtem Risiko für den MTX-Behandlungsabbruch aufgrund eines Transaminasenanstieges. Die Folatsupplementierung reduzierte die Häufigkeit eines toxisitätsbedingten Therapieabbruches bei allen MTHFR C677T-Genotypen.

MTX-Verträglichkeit und A1298C-Polymorphismus

Es ergab sich ein Zusammenhang zwischen dem A1298C-Polymorphismus und dem Auftreten von Nebenwirkungen unter MTX. Nebenwirkungen traten bei Patienten mit dem 1298AA-Genotyp signifikant häufiger auf als bei 1298CC-Patienten (87% vs. 71%); OR=2,76 [95%CI 1,2-6,3].

Unter Patienten, die keine prophylaktische Supplementierung mit Folsäure erhielten, kam es bei Patienten mit 1298AA-Genotyp signifikant häufiger zu Nebenwirkungen, als bei 1298C-Allelträgern (94% vs. 75,6%; OR=4,9 [95%CI 1,9-12,8]). Unter einer Folatsupplementierung fand sich hingegen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit der MTX-Nebenwirkungen zwischen den Genotypgruppen. Bei 1298AA-Patienten führte die Folatsupplementierung zu einer signifikanten Reduzierung der Nebenwirkungshäufigkeit (von 94% auf 67%); OR=7,6 [95%CI 2,6-22,3]. Unter Patienten mit dem 1298C-Allel zeigte sich hingegen kein wesentlicher Unterschied mit und ohne Folatsupplementierung.

An einzelnen organspezifischen Nebenwirkungen konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem Auftreten von GI-Symptomen nachgewiesen werden. Patienten mit dem 1298AA-Genotyp erlitten GI-Symptome unter MTX häufiger als die mit dem 1298CC-Genotyp (62% vs. 38%; OR=2,65 [95%CI 1,30-5,38]). Wenn die prophylaktische Folatsupplementierung mit in Betracht gezogen wurde, zeigte sich der Unterschied zwischen den 1298AA-Patienten und 1298C-Allelträgern nur in der Subgruppe von Patienten ohne Folatsupplementierung als statistisch signifikant; OR=2,78 [95%CI 1,53-5,04] (für den Gruppenvergleich „1298AA gegenüber 1298CC“: OR=2,8 [95%CI 1,2-6,4], für den „1298AA gegenüber 1298AC“: OR=2,76 [95%CI 1,41-5,59]). Unter Patienten mit dem 1298AA-Genotyp führte die Folatsupplementierung zu einer deutlichen und statistisch signifikanten Reduzierung der GI-Nebenwirkungshäufigkeit (67% ohne bzw. 44,4% mit Folatsupplementierung; OR=2,54 [95%CI 1,16-5,55]). Bei 1298C-Allelträgern zeigte sich jedoch kein wesentlicher Unterschied mit und ohne Folatgabe.

Hinsichtlich der Transaminasenerhöhung fand sich kein Zusammenhang mit dem A1298C-Polymorphismus. Unter Folatsupplementierung zeigte sich eine signifikant reduzierte Wahrscheinlichkeit für eine Transaminasenerhöhung beim 1298AA- (von 50,5% auf 19%) bzw. 1298AC-Genotyp (von 54% auf 30%), jedoch nicht bei dem 1298CC-Genotyp (35,5% vs. 27,3%).

In der Untersuchung von Schmeling et al. (2005) konnte keine Assoziation zwischen dem A1298C-Polymorphismus und der MTX-Verträglichkeit nachgewiesen werden. Patienten mit dem 1298AA- bzw. 1298AC-Genotyp zeigten MTX-Nebenwirkungen zwar häufiger (15/31 1298AA- bzw. 9/21 1298AC-Patienten) als die mit dem 1298CC-Genotyp (1/4 Patienten), der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

Auch Urano et al. (2002) fanden keinen Zusammenhang zwischen dem A1298C-SNP und dem Auftreten von Nebenwirkungen bei RA-Patienten.

Berkun et al. (2004) fanden in ihrer Untersuchung an RA-Patienten (n=92) ein signifikant erhöhtes Risiko für MTX-assoziierte Nebenwirkungen beim 1298AA-Genotyp im Vergleich mit dem 1298CC-Genotyp. Unter Patienten mit dem 1298AA-Genotyp zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Folatsupplementierung und der Nebenwirkungshäufigkeit. Auch Herrlinger et al. (2005) zeigten einen Zusammenhang des 1298AA-Genotyps mit MTX-Unverträglichkeit bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

In der Untersuchungen von Wessels et al. (2006) und Dervieux et al. (2006) konnte eine Assoziation des 1298C-Allels mit gehäuftem Auftreten von MTX-Nebenwirkungen bei RA-Patienten, die gleichzeitig eine Folatsupplementierung erhielten, gezeigt werden.

4.2. Bewertung der Ergebnisse: MTX-Wirksamkeit

Die MTX-Wirksamkeit wurde aufgrund der klinischen Verbesserung der Krankheitsaktivität nach 6 bzw. 12 Therapiemonaten evaluiert. Als primärer Endpunkt wurde eine „mindestens 30%ige Verbesserung“ nach 6 Therapiemonaten gewählt. Sekundärer Endpunkt für die Bewertung der MTX-Wirksamkeit stellte eine „mindestens 70%ige Verbesserung“ der Krankheitsaktivität nach 12 Therapiemonaten dar.

70% der Patienten erreichten eine Verbesserung der Krankheitsaktivität um mindestens 30% nach 6 Monaten unter MTX-Therapie. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der PRINTO Studie (Ruperto N, 2004). Eine statistisch signifikante Assoziation zur MTX-Wirksamkeit ergab sich für die MTX-Dosierung sowie für die Anzahl der arthritischen Gelenke bei MTX-Therapiebeginn.

MTX-Dosis $<10\text{mg}/\text{m}^2/\text{Woche}$ zeigte eine negative Assoziation mit der Wahrscheinlichkeit einer mindestens 30%igen Verbesserung nach 6 Therapiemonaten. Außerdem erreichten die Patienten mit einer Polyarthrititis eine 30%ige Verbesserung signifikant häufiger, als die mit einer Oligoarthrititis; OR=2,6 [95%CI 1,5-4,6].

Nach dem ersten Behandlungsjahr erreichten 64% der in der Analyse eingeschlossenen Patienten eine mindestens 70%ige Verbesserung der Krankheitsaktivität. Auch hier ergab sich eine Assoziation zur MTX-Wirksamkeit lediglich für die MTX-Dosierung und für die Anzahl der arthritischen Gelenke bei MTX-Therapiebeginn.

MTX-Wirksamkeit und C677T-Polymorphismus

Wir fanden keinen Zusammenhang zwischen dem C677T-Polymorphismus und dem Erreichen einer 30%igen Verbesserung nach 6 Monaten unter MTX-Therapie. Auch in der Arbeit von Schmeling et al. (2005) konnte keine Assoziation des C677T-SNP mit der MTX-Wirksamkeit gezeigt werden. Dies ist in der Übereinstimmung auch mit den meisten Untersuchungen an RA-Patienten (Berkun Y, 2004; Urano W, 2002; Van Ede AE, 2001). Wir fanden jedoch, dass die 677T-Allelträger eine höhere Wahrscheinlichkeit

aufweisen, eine komplette Krankheitsinaktivität nach 6 Therapiemonaten zu erreichen, als die Patienten mit dem 677CC-Genotyp (OR=3,5; [95%CI 1,3-9,3]. Dieser Unterschied war statistisch signifikant, allerdings bei einer sehr kleinen Fallzahl. Wessels et al. (2006) fanden einen Zusammenhang des 677C-Allels mit der Therapieeffektivität, wobei die Wirksamkeit beim 677CC-Genotyp höher war als beim 677CT-Genotyp. In der Arbeit von Dervieux et al. (2006) konnte ein erhöhtes Risiko für MTX-Therapieversagen bei RA Patienten mit dem 677TT-Genotyp gezeigt werden. Kurzawski et al. (2007) berichteten hingegen über höhere Remissionsrate bei RA-Patienten mit dem 677T-Allel im Vergleich zu Patienten mit dem 677CC Genotyp. Es muss auch berücksichtigt werden, dass sich die Therapieeffektivitätsdefinitionen zwischen den Untersuchungen häufig erheblich unterscheiden.

MTX-Wirksamkeit und A1298C-Polymorphismus

Wir fanden keinen Zusammenhang zwischen dem A1298C-Polymorphismus und der MTX-Wirksamkeit.

In der Arbeit von Schmeling et al. (2005) war die Verbesserungsrate der Aktivitätsparameter wie die Anzahl der geschwollenen und eingeschränkten Gelenke sowie BSG und CRP bei 1298C-Allelträgern höher als bei 1298AA-Patienten. Dieser Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit nicht repliziert werden. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass in der Studie von Schmeling et al. (2005) die Verbesserung der jeweiligen Parameter zwischen den Werten bei der aktuellsten Kontrolluntersuchung und den Ausgangswerten bei MTX-Therapiebeginn kalkuliert wurde. Dabei wiesen die Patienten unterschiedliche Behandlungszeiten auf (mittlere Dauer: 48 Monate, Minimum-Maximum: 3-133 Monate). Wir haben hingegen die Messung des Therapieerfolges über einen fixierten Zeitraum (6 bzw. 12 Monate nach dem Behandlungsbeginn) gewählt. Außerdem standen 21 von 58 Patienten in der Studie von Schmeling et al. (2005) unter einer Kombinationstherapie mit DMARDs. In der vorliegenden Arbeit war das MTX während der gesamten Bewertungsphase als Monotherapie zu verabreichen. Der Unterschied in der Verbesserungsdefinition bzw. -bewertungsmethodik könnte einer der Gründe für das Nichtreplizieren der Ergebnisse der Untersuchung von Schmeling et al. (2005) sein.

Auch Urano et al. (2002) fanden eine Assoziation des 1298C-Allels mit der MTX-Wirksamkeit bei RA-Patienten. Die 1298C-Allelträger zeigten einen stärkeren Rückgang der CRP- und BSG-Werte nach 3 Therapiemonaten, jedoch konnte keine Korrelation hinsichtlich der Anzahl geschwollener und eingeschränkter Gelenke gezeigt werden. Die 1298C-Allelträger wiesen außerdem niedrigere Dosierungen von MTX (<5mg/Woche) zum Zeitpunkt der letzten Kontrolluntersuchung auf (mittlere Behandlungsdauer $18 \pm 8,4$ Monate, Minimum-Maximum: 3-68 Monate). Kurzawski et al. (2007) berichteten über eine höhere Remissionsrate bei 1298C-Allelträgern im Vergleich zu Patienten mit dem 1298AA-Genotyp. Wessels et al. (2006) fanden hingegen einen Zusammenhang zwischen dem 1298AA-Genotyp und der MTX-Wirksamkeit, dabei war das gleichzeitige Vorhandensein des 677C-Allels bei 1298AA-Patienten mit noch höherer Wirksamkeit von MTX verbunden.

5. Zusammenfassung

Einleitung: Die juvenile idiopathische Arthritis ist die häufigste rheumatische Erkrankung des Kindesalters. Für Deutschland wurde eine Inzidenz zwischen 3,3 und 6,6 pro 10^5 pro Jahr und eine Prävalenz zwischen 15 und 20 pro 10^5 angegeben. MTX ist das am häufigsten eingesetzte Basistherapeutikum in der Behandlung der JIA, als Monotherapie oder in Kombination mit anderen DMARDs und/oder Biologika. In jahrzehntelanger Erfahrung erwies sich das MTX im Allgemeinen als wirksam und relativ nebenwirkungsarm. Ein Problem stellt jedoch die breite interindividuelle Variabilität des klinischen Ansprechens und der Verträglichkeit von MTX dar.

Da der therapeutische Wirkmechanismus von MTX zu einem gewissen Teil auf der Hemmung der Folatstoffwechsellenzyme beruht, können die Genpolymorphismen, welche die Folatstoffwechsellenzyme betreffen, die Pharmakokinetik bzw. Pharmakodynamik von MTX beeinflussen. MTHFR ist das Schlüsselenzym des Folatmetabolismus. Die C677T und A1298C MTHFR-Genpolymorphismen führen zu einer Verminderung der MTHFR-Enzymaktivität und zu Störungen des Folatstoffwechselgleichgewichtes. Theoretisch kann dies die Sensitivität gegenüber MTX beeinflussen. Hinsichtlich der Auswirkung dieser Polymorphismen auf die Wirksamkeit bzw. Toxizität einer MTX-Behandlung bei Kindern mit rheumatischen Erkrankungen wurde bislang nur eine Untersuchung veröffentlicht (Schmeling H, 2005). Die Ergebnisse zeigten eine Assoziation des 677T-Allels mit MTX-Toxizität und eine Assoziation des 1298C-Allels mit der MTX-Wirksamkeit. In Studien an RA-Patienten war der C677T-SNP häufig mit einem erhöhten Risiko für unerwünschte MTX-Wirkungen verbunden, vor allem wenn keine Folatsupplementierung durchgeführt wurde (Taniguchi A, 2007; Urano W, 2002; Van Ede AE, 2001). Diese Assoziation konnte jedoch in den meisten Untersuchungen bei Patienten mit einer gleichzeitigen Folatsupplementierung nicht belegt werden (Aggarwal P, 2006; Dervieux T, 2006; Spelatas M, 2005; Wessels JA, 2006). Für den A1298C-Polymorphismus ist die Datenlage schlechter. Die wenigen Untersuchungen fanden einen Zusammenhang des 1298C-Allels mit einer besseren Verträglichkeit und Wirksamkeit von MTX (Berkun Y, 2004; Dervieux T, 2006; Hughes LB, 2006; Kurzawski M, 2007; Urano W, 2002). In der Studie von Wessels et al. (2006) konnte hingegen eine Assoziation des 1298C-Allels mit MTX-Unverträglichkeit bei RA-Patienten, die Folatsupplementierung erhielten, gezeigt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der C677T und A1298C MTHFR-Genpolymorphismen hinsichtlich der Wirksamkeit und der Verträglichkeit einer MTX-Therapie bei Patienten mit einer juvenilen idiopathischen Arthritis.

Patienten und Methoden: Die Genotypanalyse auf die C677T und A1298C MTHFR-Genpolymorphismen wurde durchgeführt bei insgesamt 277 an JIA erkrankten Patienten, die eine Behandlung mit MTX mit (n=77) bzw. ohne (n=200) eine gleichzeitige Supplementierung von Folsäure erhielten.

Die Bestimmung der 677C>T- und 1298A>C-Polymorphismen erfolgte durch PCR und darauffolgenden Restriktionsverdau des PCR-Produktes mittels *HinfI* und *MboII* Restriktionsenzyme. Die Bewertungsendpunkte waren: 1) die Parameter der Therapieeffektivität, wie eine mindestens 30%ige Verbesserung der Krankheitsaktivität nach 6 bzw. eine mindestens 70%ige Verbesserung der Krankheitsaktivität nach 12 Monaten unter MTX; 2) das Auftreten von MTX-assoziierten Nebenwirkungen im Therapieverlauf. Die erforderlichen klinischen Daten zur Beurteilung der Wirksamkeit bzw. der Verträglichkeit von MTX wurden retrospektiv aus Krankenakten der Patienten sowie mit Hilfe eines Fragebogens erhoben. Anschließend wurde die Verteilung der Effektivitäts- bzw. Verträglichkeitsparameter unter Patienten mit einzelnen C677T- bzw. A1298C-Genotypen hinsichtlich der eventuellen Zusammenhänge zwischen dem Genotyp und der Wirksamkeit bzw. der Toxizität einer MTX-Therapie analysiert.

Ergebnisse: Die 677T- bzw. 1298C-Allelhäufigkeiten lagen bei 0,34 bzw. bei 0,32. 35 Patienten hatten den 677TT-Genotyp, 42 Patienten wiesen den 1298CC-Genotyp auf. Die Verteilung der A1298C-Genotypen zeigte eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium, es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Allel- bzw. Genotypfrequenz zwischen den Studienpatienten und historischen gesunden Kontrollen.

677C>T: Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem C677T-Polymorphismus und dem Auftreten von Nebenwirkungen im Allgemeinen gezeigt werden. Die Folatsupplementierung führte zu einer deutlichen Reduzierung der Häufigkeit von Nebenwirkungen bei Patienten mit dem 677TT-Genotyp, OR = 16 [95%CI 2,0 - 127,9]. Unter Patienten mit dem 677CC- bzw. dem 677CT-Genotyp zeigte sich kein wesentlicher Unterschied mit und ohne Folsäure. Hinsichtlich der Art der Nebenwirkungen ergab sich lediglich ein Zusammenhang des 677TT-Genotyps mit dem Auftreten einer oralen Mukositis unter MTX. Die Patienten mit dem 677TT-Genotyp erlitten eine Mukositis unter MTX-Therapie signifikant häufiger als die mit dem 677CC-Genotyp; OR = 4,95 [95%CI 1,25-19,6].

1298A>C: Der A1298C-Polymorphismus war mit dem Auftreten von MTX-Nebenwirkungen assoziiert. MTX-Nebenwirkungen traten bei Patienten mit dem 1298AA-Genotyp signifikant häufiger auf als bei 1298C-Allelträgern, vor allem wenn keine Folatsupplementierung verabreicht wurde; OR=4,9 [95%CI 1,9-12,8]. Unter Patienten mit dem 1298AA-Genotyp führte die Folatsupplementierung zu einer signifikanten Reduzierung der Häufigkeit von Nebenwirkungen; OR=7,6 [95%CI 2,6-22,3]. Unter 1298C-Allelträgern zeigte sich hingegen kein wesentlicher Unterschied. An einzelnen Nebenwirkungen konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang nur mit dem Auftreten von gastrointestinalen (GI) Symptomen nachgewiesen werden. Die Patienten mit dem 1298AA-Genotyp erlitten GI-Symptome unter MTX häufiger als die 1298C-Allelträger, vor allem wenn keine Folatsupplementierung verabreicht wurde; OR=2,78 [95%CI 1,53-5,04]. Die Folatsupplementierung führte zur Reduzierung der GI-Nebenwirkungshäufigkeit bei 1298AA-Patienten (OR=2,54 [95%CI 1,16-5,55]), zeigte jedoch keine positive Wirkung bei 1298C-Allelträgern. Außerdem zeigte sich unter Folatsupplementierung eine reduzierte Wahrscheinlichkeit für eine Transaminasenerhöhung beim 1298AA- (von 50,5% auf 19%) bzw. 1298AC-Genotyp (von 54% auf 30%), jedoch nicht beim 1298CC-Genotyp (35,5% vs. 27,3%). Keiner der beiden Polymorphismen zeigte einen Zusammenhang mit der Wirksamkeit der MTX-Therapie.

Schlussfolgerung: Der 1298AA-Genotyp war mit MTX-Unverträglichkeit verbunden, vor allem wenn keine Supplementierung von Folsäure durchgeführt wurde. Das Vorhandensein des 1298C-Allels führte zu einer besseren Verträglichkeit der MTX-Therapie. Der 677C>T-Polymorphismus zeigte keinen Zusammenhang mit MTX-Toxizität im Allgemeinen. Der 677TT-Genotyp war jedoch mit dem Auftreten einer oralen Mukositis assoziiert. Mit einer gleichzeitigen Folatgabe konnte die Nebenwirkungswahrscheinlichkeit (vor allem die der GI- und Lebertoxizität) bei Patienten mit dem 1298AA- bzw. 677TT-Genotyp deutlich reduziert werden. Die Patienten mit dem 677CT-/CC- sowie die mit dem 1298AC-/CC-Genotyp hatten eine geringere Wahrscheinlichkeit, von einer Folatsupplementierung zu profitieren.

6. Literaturverzeichnis

- AAP. 2006.** Immunocompromised Children. [Hrsg.] American Academy of Pediatrics. *Red Book: 2006 Report of the Committee on Infectious Diseases*. 26th ed. Elk Grove Village, IL. : Pickering LK, 2006, S. 71-85.
- Adib N, Silman A, Thomson W. 2005.** Outcome following onset of juvenile idiopathic inflammatory arthritis: I. Frequency of different outcomes. *Rheumatology*. 2005, 44, S. 995-1001.
- Aggarwal P, Naik S, Mishra KP, et al. 2006.** Correlation between Methotrexate efficacy & toxicity with C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate gene in rheumatoid arthritis patients on folate supplementation. *Indian J Med Res*. 2006, 124(11), S. 521-526.
- Akar N, Akar E, Ozel D, et al. 2001.** Common mutations at the homocysteine metabolism pathway and pediatric stroke. *Thromb Res*. 2001, 102, S. 115-120.
- Alsufyani K, Ortiz-Alvarez O, Cabral DA, et al. 2004.** The role of subcutaneous administration of methotrexate in children with juvenile idiopathic arthritis who have failed oral methotrexate. *J Rheumatol*. 2004, 31(1), S. 179-182.
- Ananth CV, Peltier MR, De Marco C, et al. 2007.** Associations between two polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and placental abruption. *Am J Obstet Gynecol*. 2007, 197(4), S. 1-7.
- Aplenc R, Thompson J, Han P, et al. 2005.** Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2005, 65(6), S. 2482-2487.
- Ashfield-Watt PA, Pullin CH, Whiting JM, et al. 2002.** Methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T genotype modulates homocysteine responses to a folate-rich diet or a low-dose folic acid supplement: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2002, 76, S. 180-186.
- Balis FM, Holcenberg JS, Poplack DG, et al. A Joint Children's Cancer Group and Pediatric Oncology Branch Study. 1998.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral methotrexate and mercaptopurine in children with lower risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1998, 92(10), S. 3569-3577.
- Balis FM, Mirro J Jr, Reaman GH, et al. 1988.** Pharmacokinetics of subcutaneous methotrexate. *J Clin Oncol*. 1988, 6(12), S. 1882-1886.
- Balis FM, Savitch JL, Bleyer WA. 1983.** Pharmacokinetics of oral methotrexate in children. *Cancer Res*. 1983, 43(5), S. 2342-2345.
- Bannwarth B, Pehourcq F, Schaefferbeke T, Dehais J. 1996.** Clinical pharmacokinetics of low-dose pulse methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacokinet*. 1996, 30(3), S. 194-210.
- Barber R, Shalat S, Hendricks K, et al. 2000.** Investigation of folate pathway gene polymorphisms and the incidence of neural tube defects in a Texas Hispanic population. *Mol Genet Metabolism*. 2000, 70, S. 45-52.
- Berkun Y, Levartovsky D, Rubinow A, et al. 2004.** Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene. *Ann Rheum Dis*. 2004, 63, S. 1227-1231.
- Berntson L, Andersson Gäre B, Fasth A, et al. und Group., Nordic Study. 2003.** Incidence of juvenile idiopathic arthritis in the Nordic countries: a population based study with special reference to the validity of the ILAR and EULAR criteria. *J Rheumatol*. 2003, 30(10), S. 2275-82.
- Blount BC, Mack MM, Wehr CM, et al. 1997.** Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997, 94, S. 3290-3295.

- Boccia S, Hung R, Ricciardi G, et al. 2008.** Meta- and pooled analyses of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and gastric cancer risk: a HUGES review. *Am J Epidemiol.* 2008, 167(5), S. 505-516.
- Botto LD, Yang Q. 2000.** 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variant and congenital anomalies: a HUGES review. *Am J Epidemiol.* 2000, 151, S. 862-877.
- Braun J, Kästner P, Flaxenberg P, et al., for the MC-MTX.6/RH Study Group. 2008.** Comparison of the clinical efficacy and safety of subcutaneous versus oral administration of methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. Results of a six-month, multicenter, randomized, double-blind, controlled, phase IV trial. *Arthritis Rheum.* 2008, 58(1), S. 73-81.
- Brewer EJ, Bass J, Baum J, et al. 1977.** Current proposed revision of JRA criteria. *Arthritis Rheum.* 1977, 20(Suppl), S. 195-199.
- Brookes AJ. 1999.** The essence of SNPs. *Gene.* 1999, 234, S. 177-186.
- Brown AK, Quinn MA, Karim Z, et al. 2006.** Presence of significant synovitis in rheumatoid arthritis patients with disease-modifying antirheumatic drug-induced clinical remission: evidence from an imaging study may explain structural progression. *Arthritis Rheum.* 2006, 54, S. 3761-3773.
- Brunner HI. 2002.** Preliminary definition of disease flare in juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2002, 29, S. 1058-1064.
- Camiciottoli G, Trapani S, Castellani W, et al. 1998.** Effect on lung function of methotrexate and non-steroid anti-inflammatory drugs in children with juvenile rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 1998, 18(1), S. 11-16.
- Casas JP, Hingorani AD, Bautista LE, Sharma P. 2004.** Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18.000 cases and 58.000 controls. *Arch Neurol.* 2004, 61, S. 1652-1662.
- Cassidy JT. 2005.** Chronic arthritis in childhood. [Hrsg.] James Cassidy und Ross Petty. *Textbook of pediatric rheumatology.* 5.Edition. Philadelphia : Saunders, 2005.
- Cassidy JT, Levinson JE, Bass JC, et al. 1986.** A study of classification criteria for a diagnosis of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1986, 29(2), S. 274-281.
- Castro R, Rivera I, Ravasco P, et al. 2004.** 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C-T and 1298A-C mutations are associated with DNA hypomethylation. (Letter). *J Med Genet.* 2004, 41, S. 454-458.
- Castro R, Riviera I, Ravasco P, et al. 2003.** 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T and 1298A→C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine. *Q J Med.* 2003, 96, S. 297-303.
- Chan ES, Fernandez P, Cronstein BN. 2007.** Adenosine in inflammatory joint diseases. *Purinergic signaling.* 2007, 3, S. 145-152.
- Chen J, Stampfer MJ, Ma J, et al. 2001.** Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2001, 154, S. 667-672.
- Cheng Q, Wu B, Kager L, et al. 2004.** A substrate specific functional polymorphism of human gamma-glutamyl hydrolase alters catalytic activity and methotrexate polyglutamate accumulation in acute lymphoblastic leukaemia cells. *Pharmacogenetics.* 2004, 14, S. 557-567.
- Cleary AG, McDowell H, Sills JA. 2002.** Polyarticular juvenile idiopathic arthritis treated with methotrexate complicated by the development of non-Hodgkin's lymphoma. *Arch Dis Child.* 2002, 86, S. 47-49.
- Common Toxicity Criteria, Version 2.0 (CTC v2.0).** [Publish Date April 30, 1999]. *Cancer Therapy Evaluation Program (CTEP).* National Cancer Institute (NCI), U.S. National Institutes of Health (NIH) (www.cancer.gov).

- Cron RQ, Sherry DD, Wallace CA. 1998.** Methotrexate induced hypersensitivity pneumonitis in a child with juvenile rheumatoid arthritis. *J Pediatr.* 1998, 132, S. 901-902.
- Cronstein BN. 2005.** Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev.* 2005, 57, S. 163-172.
- Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, et al. 2001.** Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2001, 60, S. 729-735.
- De Laet C, Wautrecht JC, Brasseur D, et al. 1999.** Plasma homocysteine concentrations in a Belgian school-age population. *Am J Clin Nutr.* 1999, 69, S. 968-972.
- Dekou V, Whincup P, Papacosta O, et al. 2001.** The effect of the C677T and A1298C polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene on homocysteine levels in elderly men and women from the British regional heart study. *Atherosclerosis.* 2001, 154, S. 659-666.
- Delvin EE, Rozen R, Merouani A, et al. 2000.** Influence of methylenetetrahydrofolate reductase genotype, age, vitamin B-12, and folate status on plasma homocysteine in children. *Am J Clin Nutr.* 2000, 72, S. 1469-1473.
- Dervieux T, Furst D, Lein DO, et al. 2004.** Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004, 50, S. 2766-2774.
- Dervieux T, Greenstein N, Kremer J. 2006.** Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006, 54(10), S. 3095-3103.
- Dervieux T, Kremer J, Lein DO, et al. 2004.** Contribution of common polymorphisms in reduced folate carrier and γ -glutamylhydrolase to methotrexate polyglutamate levels in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics.* 2004, 14, S. 733-739.
- Eberhard BA, Sison MC, Gottlieb BS, Ilowite NT. 2004.** Comparison of the intraarticular effectiveness of triamcinolone hexacetonide and triamcinolone acetonide in treatment of juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2004, 31, S. 2507-2512.
- Evans WE, McLeod HL. 2003.** Pharmacogenomics – drug disposition, drug targets, and side effects. *NEJM.* 2003, 348(6), S. 538-549.
- Falcini F, Taccetti G, Ermini M, et al. 1997.** Methotrexate-associated appearance and rapid progression of rheumatoid nodules in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997, 40, S. 175-178.
- Fink CW. 1995.** Proposal for the development of classification criteria for idiopathic arthritides of childhood. *J Rheumatol.* 1995, 22, S. 1566-1569.
- Foell D, Frosch M, Schulze zur Wiesch A, et al. 2004.** Methotrexate treatment in juvenile idiopathic arthritis: when is the right time to stop? *Ann Rheum Dis.* 2004, 63, S. 206-208.
- Foster HE, Marshall N, Myers A, et al. 2003.** Outcome in adults with juvenile idiopathic arthritis: a quality of life study. *Arthritis Rheum.* 2003, 48, S. 767-775.
- Franke J, Häfner R, Lohrs U, Truckenbrodt H. 1996.** Methotrexate and liver fibrosis in juvenile chronic arthritis retrospective study of 73 liver biopsies. *Monatsschrift Kinderheilkunde.* 1996, 144(2), S. 147-151.
- Friso S, Choi SW, Girelli D, et al. 2002.** A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Nat Acad Sci.* 2002, 99, S. 5606-5611.

- Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. 1995.** A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet.* 1995, 10, S. 111-113.
- Ganser G, Minden K. 2007.** Juvenile idiopathische Arthritis: Oligoartikulärer Verlaufsform. [Hrsg.] Norbert Wagner und Günther Dannecker. *Pädiatrische Rheumatologie.* Berlin : Springer Verlag, 2007, S. 206-207.
- Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S, et al. 2001.** The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis.* 2001, 157, S. 451-456.
- Gerloni V, Pontikaki I, Gattinara M, Fantini F. 2008.** Focus on adverse events of tumour necrosis factor alpha blockade in juvenile idiopathic arthritis in an open monocentric long-term prospective study of 163 patients. *Ann Rheum Dis.* 2008, 67(8), S. 1145-1152.
- Giannini EH, Brewer EJ, Kuzmina N, et al. 1992.** Methotrexate in resistant juvenile rheumatoid arthritis: results of the U.S.A.- U.S.S.R. double-blind, placebo-controlled trial. *NEJM.* 1992, 326, S. 1043-1049.
- Giannini EH, Cassidy JT, Brewer EJ, et al. 1993.** Comparative efficacy and safety of advanced drug therapy in children with juvenile rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 1993, 23(1), S. 34-46.
- Giannini EH, Ruperto N, Ravelli A, et al. 1997.** Preliminary definition of improvement in juvenile arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997, 40(7), S. 1202-1209.
- Gilbody S, Lewis S, Lightfoot T. 2007.** Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genetic polymorphisms and psychiatric disorders: a HuGE Review. *Am J Epidemiol.* 2007, 165(1), S. 1-13.
- Goddard KA, Tromp G, Romero R, et al. 2007.** Candidate-gene association study of mothers with pre-eclampsia, and their infants, analyzing 775 SNPs in 190 genes. *Hum Hered.* 2007, 63, S. 1-16.
- Godfrey C, Sweeney K, Miller K, et al. 1998.** The population pharmacokinetics of long-term methotrexate in rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol.* 1998, 46(4), S. 369-376.
- Goto Y, Yue L, Yokoi A, et al. 2001.** A novel single-nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the human dihydrofolate reductase gene with enhanced expression. *Clin Cancer Res* 2001;7:1952-6. 2001, 7, S. 1952-1956.
- Gottlieb BS, Keenan GF, Lu T, Ilowite NT. 1997.** Discontinuation of methotrexate treatment in juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatrics.* 1997, 100, S. 994-997.
- Goyette P, Pai A, Milos R, et al. 1998.** Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome* 1998; 9:652-656. 1998, 9, S. 652-656.
- Goyette P, Sumner J, Milos R, et al. 1994.** Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genet.* 1994, 7, S. 195-200.
- Graham LD, Myones BL, Rivas-Chacon RF, Pachman LM. 1992.** Morbidity associated with longterm methotrexate therapy in juvenile rheumatoid arthritis. *J Pediatr.* 1992, 120(3), S. 468-473.
- Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, et al. 2006.** Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr.* 2006, 86, S. 701-707.
- Guinotte CL, Burns MG, Axume JA, et al. 2003.** Methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T variant modulates folate status response to controlled folate intakes in young women. *J Nutr.* 2003, 133, S. 1272-1280.
- Gutierrez-Suarez R, Pistorio A, Cespedes Cruz A, et al. 2007.** Pediatric Rheumatology International Trials Organization (PRINTO). Health-related quality of life of patients with juvenile idiopathic arthritis coming from 3

different geographic areas. The PRINTO multinational quality of life cohort study. *Rheumatology (Oxford)*. 2007, 46, S. 314-320.

Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I, et al. 1996. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (equal to or greater than 40micromole/liter): the Hordaland homocysteine study. *J Clin Invest*. 1996, 98, S. 2174-2183.

Haagsma CJ, Blom HJ, van Riel PL, et al. 1999. Influence of sulphasalazine, Methotrexate, and the combination of both on plasma homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1999, 58, S. 79-84.

Hamilton RA, Kremer JM. 1997. Why intramuscular methotrexate may be more efficacious than oral dosing in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*. 1997, 36, S. 86-90.

Harmon DL, Shields DC, Woodside JV, et al. 1999. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. *Genet Epidemiol*. 1999, 17, S. 298-309.

Harten P. 2005. Folsäure zur Reduktion der Methotrexat-Toxizität. *Z Rheumatol*. 2005, 64, S. 353-358.

Hashkes PJ, Balistreri WF, Bove KE, et al. 1999. The relationship of hepatotoxic risk factors and liver histology in methotrexate therapy for juvenile rheumatoid arthritis. *J Pediatr*. 1999, 134, S. 47-52.

Hashkes PJ, Balistreri WF, Bove KE, et al. 1997. The long-term effect of methotrexate therapy on the liver in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1997, 40, S. 2226-2234.

Hashkes PJ, Laxer RM. 2005. Medical treatment of juvenile idiopathic arthritis. *JAMA*. 2005, 294, S. 1671-1684.

Heijmans BT, Gussekloo J, Kluft C, et al. 1999. Mortality risk in men is associated with a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR). *Eur J Hum Genet*. 1999, 7, S. 197-204.

Heiligenhaus A, Horneff G, Greiner K, et al. 2007. Inhibitors of tumour necrosis factor-alpha for the treatment of arthritis and uveitis in childhood. *Klin Monatsbl Augenheilkd*. 2007, 224(6), S. 526-531.

Herrlinger KR, Cummings F, Barnardo M, et al. 2005. The pharmacogenetics of methotrexate in inflammatory bowel disease. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2005, 15, S. 705-711.

Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, et al. 2000. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factor for Down syndrome. *Am J Hum Genet*. 2000, 67, S. 623-630.

Hoekstra M, Haagsma C, Neef C, et al. 2004. Bioavailability of higher dose methotrexate comparing oral and subcutaneous administration in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2004, 31(4), S. 645-648.

Horneff G, De Bock F, Girschick HJ, et al. 2008. Safety and efficacy of combination of Etanercept and Methotrexate compared to treatment with Etanercept only in patients with juvenile idiopathic arthritis (JIA). Preliminary data from the German JIA Registry. *Ann Rheum Dis*. 2008, [Epub ahead of print]. 15 Apr 2008. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18413440>>.

Horneff G, Schmeling H, Biedermann T, et al. 2004. The German etanercept registry for treatment of juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2004, 63(12), S. 1638-1644.

Hughes LB, Beasley TM, Patel H, et al. 2006. Racial or ethnic differences in allele frequencies of single-nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and their influence on response to Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2006, 65, S. 1213-1218.

Hunt PG, Rose CD, McIlvain-Simpson G, Tejani S. 1997. The effects of daily intake of folic acid on the efficacy of methotrexate therapy in children with juvenile rheumatoid arthritis: a controlled study. *J Rheumatol*. 1997, 24, S. 2230-2232.

- Isolato PA, Donnelly JG. 2000.** Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase mutations in patients with venous thrombosis. *Mol Diagn.* 2000, 5, S. 59-66.
- Isolato PA, Wells GA, Donnelly JG. 2000.** Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet.* 2000, 67, S. 986-990.
- Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, et al. 1996.** Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation.* 1996, 93, S. 7-9.
- James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, et al. 1999.** Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr.* 1999, 70, S. 495-501.
- Junemann AG, von Ahsen N, Reulbach U, et al. 2005.** C677T variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 2005, 139, S. 721-723.
- Keim D, Ragsdale C, Heidelberger K, Sullivan DB. 1990.** Hepatic fibrosis with the use of methotrexate for juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1990, 17, S. 846-848.
- Kelly PJ, Rosand J, Kistler JP, et al. 2002.** Homocysteine, MTHFR 677C-T polymorphism, and risk of ischemic stroke: results of a meta-analysis. *Neurology.* 2002, 59, S. 529-536.
- Khanna D, Park CS, Paulus HE, et al. 2005.** Reduction of the efficacy of methotrexate by the use of folic acid. Post hoc analysis from two randomized controlled studies. *Arthritis Rheum.* 2005, 52(10), S. 3030-3038.
- Kiessling U, Köring E, Listing J, et al. 1998.** Incidence and prevalence of juvenile chronic arthritis in East Berlin 1980-88. *J Rheumatol.* 1998, 25, S. 1837-1843.
- Killeen OG, Gardner-Medwin JM. 2006.** In juvenile idiopathic arthritis, is folate supplementation effective against methotrexate toxicity at the expense of methotrexate's efficacy? *Arch Dis Child.* 2006, 91, S. 537-538.
- Kirke PN, Mills JL, Molloy AM, et al. 2004.** Impact of the MTHFR C677T polymorphism on risk of neural tube defects: case-control study. *BMJ.* 2004, 328, S. 1535-1536.
- Klerk M, Verhoef P, Clarke R, et al. MTHFR Studies Collaboration Group. 2002.** MTHFR 677C-T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA.* 2002, 288, S. 2023-2031.
- Kowa H, Yasui K, Takeshima T, et al. 2000.** The homozygous C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for migraine. *Am J Med Genet (Neurophysiatr Genet).* 2000, 96, S. 762-764.
- Kremer JM. 2006.** Methotrexate pharmacogenomics. *Ann Rheum Dis.* 2006, 65, S. 1121-1123.
- Kremer JM. 2004.** Toward a better understanding of methotrexate. *Arthritis Rheum.* 2004, 50(5), S. 1370-1382.
- Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A, Kamen B. 1986.** Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients: association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis Rheum.* 1986, 29, S. 832-835.
- Krugmann J, Sailer-Hock M, Muller T, et al. 2000.** Epstein-Barr virus associated Hodgkin's lymphoma and Legionella pneumophila infection complicating treatment of juvenile rheumatoid arthritis with methotrexate and cyclosporine A. *Hum Pathol.* 2000, 31, S. 253-255.
- Kugathasan S, Newman AJ, Dahms BB, Boyle JT. 1996.** Liver biopsy findings in patients with juvenile rheumatoid arthritis receiving long-term, weekly methotrexate therapy. *J Pediatr.* 1996, 128(1), S. 149-151.

Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, et al. 2003. Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med.* 2003, 11(5), S. 593-600.

Kurzawski M, Pawlik A, Safranow K, et al. 2007. 677C>T and 1298A>C MTHFR polymorphisms affect MTX treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics.* 2007, 8(11), S. 1551-1559.

Kvien TK, Hoyeraal HM, Sandstad B. 1986. Azathioprine versus placebo in patients with juvenile rheumatoid arthritis: a single center double blind comparative study. *J Rheumatol.* 1986, 13, S. 118-123.

Lafforgue P, Monjanel-Mouterde S, Durand A, et al. 1995. Lack of correlation between pharmacokinetics and efficacy of low dose methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1995, 22(5), S. 844-849.

Lahdenne P, Rapola J, Ylijoki H, Haapasaari J. 2002. Hepatotoxicity in patients with juvenile idiopathic arthritis receiving longterm methotrexate therapy. *J Rheumatol.* 2002, 29(11), S. 2442-2445.

Lambert CM, Sandhu S, Lochhead A, et al. 2004. Dose escalation of parenteral methotrexate in active rheumatoid arthritis that has been unresponsive to conventional doses of methotrexate. A randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2004, 50(2), S. 364-371.

Lehman TJ, Schechter SJ, Sundel RP, et al. 2004. Thalidomide for severe systemic onset juvenile rheumatoid arthritis. *J Pediatr.* 2004, 145, S. 856-857.

Li X.-M., Wei Y.-F., Hao H.-L., et al. 2002. Hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T mutation in Budd-Chiari syndrome. *Am J Hemat.* 2002, 71, S. 11-14.

Lievers KJ, Boers GH, Verhoef P, et al. 2001. A second common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk. *J Mol Med.* 2001, 79, S. 522-528.

Linde L, Hetland ML, Østergaard M. 2006. Drug survival and reasons for discontinuation of intramuscular methotrexate: a study of 212 consecutive patients switching from oral methotrexate. *Scand J Rheumatol.* 2006, 35, S. 102-106.

Londino AV Jr, Blatt J, Knisely AS. 1998. Hodgkin's disease in a patient with juvenile rheumatoid arthritis taking weekly low dose methotrexate. *J Rheumatol.* 1998, 25, S. 1245-1246.

Lovell DJ, Giannini EH, Reiff A, et al. 2000. Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. *NEJM.* 2000, 342(11), S. 763-769.

Lovell DJ, Giannini EH, Reiff A, et al. 2006. Long-term efficacy and safety of etanercept in children with polyarticular-course juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006, 54(6), S. 1987-1994.

Lovell DJ, Giannini EH, Reiff A, et al. 2003. Long-term efficacy and safety of etanercept in children with polyarticular-course juvenile rheumatoid arthritis: interim results from an ongoing multicenter, open-label, extended-treatment trial. *Arthritis Rheum.* 2003, 48(1), S. 218-226.

Lovell DJ, Reiff A, Ilowite NT, et al. 2008. Safety and efficacy of up to eight years of continuous Etanercept therapy in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008, 58(5), S. 1496-1504.

Manners PJ, Bower C. 2002. Worldwide prevalence of juvenile arthritis – why does it vary so much? *J Rheumatol.* 2002, 29, S. 1520-1530.

Martin YN, Salavaggione OE, Eckloff BW, et al. 2006. Human methylenetetrahydrofolate reductase pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics. *Pharmacogenet. Genomics.* 2006, 16, S. 265-277.

- McDermott AP, Mills JL, Kirke PN, et al. 2003.** Analysis of MTHFR 1298AC and 677CT polymorphisms as risk factors for neural tube defects. *J Hum Genet.* 2003, 48, S. 190-193.
- Meisel C, Cascorbi I, Gerloff T, et al. 2001.** Identification of six methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotypes resulting from common polymorphisms: impact on plasma homocysteine levels and development of coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2001, 154, S. 651-658.
- Michels H. 2005.** Juvenile idiopathische Arthritis - wann brauchen wir Glukokortikoide? *Akt Rheumatol.* 2005, Bd. 30, S. 183-186.
- Mier R. 2006.** Recent therapeutic advances in the care of children with chronic arthritis. *Cur Opin Orthop.* 2006, 17, S. 526-530.
- Mills JL, Kirke PN, Molloy AM, et al. 1999.** Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral cleft. *Am J Med Genet.* 1999, 86, S. 71-74.
- Minden K. 2007.** Juvenile idiopathische Arthritis: Epidemiologie. [Hrsg.] Norbert Wagner und Günther Dannecker. *Pädiatrische Rheumatologie.* Berlin : Springer Verlag, 2007, S. 179-181.
- Minden K, Niewerth M, Borte M, et al. 2007.** Impfungen bei rheumatischen Erkrankungen des Kindes- und Jugendalters. *Z Rheumatol.* 2007, 66, S. 111-120.
- Munoz-Moran E, Dieguez-Lucena JL, Fernandez-Arcas N, et al. 1998.** Genetic selection and folate intake during pregnancy. *Lancet.* 1998, 352, S. 1120-1121.
- Munro R, Porter DR, Sturrock RD. 1998.** Lymphadenopathy in a patient with systemic onset juvenile chronic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1998, 57, S. 513-517.
- Must A, Jacques PF, Rogers G, et al. 2003.** Serum total homocysteine concentrations in children and adolescents: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Nutr.* 2003, 133, S. 2643-2649.
- Muzaffer MA, Schneider R, Cameron B, et al. 1996.** Accelerated nodulosis during methotrexate therapy for juvenile rheumatoid arthritis. *J Pediatr.* 1996, 128, S. 698-700.
- Niehues T, Horneff G, Michels H, et al. 2004.** Evidenzbasierter Einsatz von Methotrexat bei Kindern mit rheumatischen Erkrankungen. Konsensusstatement der Arbeitsgemeinschaft Kinder- und Jugendrheumatologie Deutschland (AGKJR) und Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Rheumatologie Österreich. *Z Rheumatol.* 2004, 63, S. 147-159.
- Ogino S, Wilson RB. 2003.** Genotype and haplotype distributions of MTHFR 677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *J Hum Genet.* 2003, 48, S. 1-7.
- Ortiz Z, Shea B, Suarez-Almazor ME, et al. 1999.** Folic acid and folinic acid for reducing side effects in patients receiving methotrexate for rheumatoid arthritis. . *Cochrane Database of systematic reviews.* 1999, Issue 4.
- Ortiz-Alvarez O, Morishita K, Avery G, et al. 2004.** Guidelines for blood test monitoring of methotrexate toxicity in juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol.* 2004, 31, S. 2501-2506.
- Packham JC, Hall MA. 2002.** Long-term follow-up of 246 adults with juvenile idiopathic arthritis: functional outcome. *Rheumatology.* 2002, 41, S. 1428-1435.
- Padeh S, Passwell JH. 1998.** Intraarticular corticosteroid injections in the management of children with chronic arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998, 41, S. 1210-1214.
- Padeh S, Sharon N, Schiby G, et al. 1997.** Hodgkin's lymphoma in systemic onset juvenile rheumatoid arthritis after treatment with low dose methotrexate. *J Rheumatol.* 1997, 24, S. 2035-2037.

Papoutsakis C, Yiannakouris N, Manios Y, et al. 2005. Plasma homocysteine concentrations in Greek children are influenced by an interaction between methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and folate status. *J Nutr.* 2005, 135, S. 383-388.

Pawlik A, Wrzesniewska J, Fiedorowicz-Fabrycy I, Gawronska-Szklarz B. 2004. The MDR1 3435 polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2004, 42, S. 496-503.

Pelucci A, Lomater C, Gerloni V, et al. 1994. Lung function and diffusing capacity for carbon monoxide in patients with juvenile chronic arthritis: effect of disease activity and low dose methotrexate therapy. *Clin Exp Rheumatol.* 1994, 12(6), S. 675-679.

Petty RE, Southwood TR, Manners P, et al. 2004. International League of Associations for Rheumatology classification of Juvenile Idiopathic Arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol.* 2004, 31(2), S. 390-2.

Prince FH, Twilt M, Ten Cate R, et al. 2008. Long-term follow-up on effectiveness and safety of etanercept in JIA: the Dutch national register. *Ann Rheum Dis.* 2008, Apr 15: Epub ahead of print.

Ranganathan P. 2008. An update on methotrexate pharmacogenetics in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics.* 2008, 9(4), S. 439-451.

Ranganathan P, McLeod HL. 2006. Methotrexate pharmacogenetics. The first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006, 54(5), S. 1366-1377.

Ravelli A, Di Fuccia G, Molinaro M, et al. 1993. Plasma levels after oral methotrexate in children with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1993, 20(9), S. 1573-1577.

Ravelli A, Migliavacca D, Viola S, et al. 1999. Efficacy of folinic acid in reducing methotrexate toxicity in juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 1999, 17(5), S. 625-627.

Ravelli A, Viola S, Ramenghi B, et al. 1995. Frequency of relapse after discontinuation of methotrexate therapy for clinical remission in juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1995, 22(8), S. 1574-1576.

Richter B, Stegmann K, Röper B, et al. 2001. Interaction of folate and homocysteine pathway genotypes evaluated in susceptibility to neural tube defects (NTD) in a German population. *J Hum Genet.* 2001, 46(3), S. 105-109.

Ringold S, Wallace CA. 2007. Measuring clinical response and remission in JIA. *Curr Opin Rheumatol.* 2007, 19(5), S. 471-476.

Rozin A, Shapira D, Balbir-Gurman A, et al. 2002. Relapse of rheumatoid arthritis after substitution of oral for parenteral administration of methotrexate. *Ann Rheum Dis.* 2002, 61, S. 756-757.

Ruperto N, Murray KJ, Gerloni V, et al. 2004. A randomized trial of parenteral methotrexate comparing an intermediate dose with a higher dose in children with juvenile idiopathic arthritis who failed to respond to standard doses of methotrexate. *Arthritis Rheum.* 2004, 50, S. 2191-2201.

Ruperto N, Ravelli A, Pistorio A, et al. 2001. Cross-cultural adaptation and psychometric evaluation of the Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ) and the Child Health Questionnaire (CHQ) in 32 countries. *Clin Exp Rheumatol.* 2001, 19(Suppl 23), S. 1-9.

Scher AI, Terwindt GM, Verschuren WMM, et al. 2006. Migraine and MTHFR C677T genotype in a population-based sample. *Ann Neurol.* 2006, 59, S. 372-375.

Schmeling H, Biber D, Heins S, Horneff G. 2005. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms on efficacy and toxicity of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol.* 2005, 32, S. 1832-1836.

Schmeling H, Stephan V, Burdach S, Horneff G. 2002. Pulmonary function in children with juvenile idiopathic arthritis and effects of methotrexate therapy. *Z Rheumatol.* 2002, 61(2), S. 168-172.

Schnakenberg E, Mehles A, Cario G, et al. 2005. Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and susceptibility to pediatric acute lymphoblastic leukemia in a German study population. *BMC Medical Genetics.* 2005, 6:23.

Schneider JA, Rees DC, Liu YT, et al. 1998. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet.* 1998, 62, S. 1258-1260.

Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, et al. 1998. Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptional vitamin use, and cleft lip. *Am J Med Genet.* 1998, 80, S. 196-198.

Sherry DD, Stein LD, Reed AM, et al. 1999. Prevention of leg length discrepancy in young children with pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis by treatment with intraarticular steroids. *Arthritis Rheum.* 1999, 42, S. 2330-2334.

Silverman E, Mouy R, Spiegel L, et al. 2005. Leflunomide or methotrexate for juvenile rheumatoid arthritis. *NEJM.* 2005, 352(16), S. 1655-1666.

Sohda S, Arinami T, Hamada H, et al. 1997. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia. *J Med Genet.* 1997, 34, S. 525-526.

Spelatas M, Papadopoulos N, Daiou C, et al. 2005. Relationship between 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism and methotrexate related toxicity in patients with autoimmune diseases receiving folic acid supplementation. *Ann Rheum Dis.* 2005, 64, S. 1791-1792.

Stabile A, Bertoni B, Ansuini V, et al. 2006. The clinical spectrum and treatment options of macrophage activation syndrome in the pediatric age. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2006, 10(2), S. 53-59.

Ständige Impfkommission (STIKO) am Robert Koch Institut. 2005. Empfehlungen der STIKO zu Impfungen für Patienten mit Immundefizienz. *Epidemiologisches Bulletin* 39/2005. 2005, Sonderdruck Nov. 2005.

Stern LL, Mason JB, Selhub J, et al. 2000. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000, 9, S. 849-853.

Takeyama J, Sato A, Nakano K, et al. 2006. Epstein-Barr virus associated Hodgkin lymphoma in a 9-year-old girl receiving long-term methotrexate therapy for juvenile idiopathic arthritis. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2006, 28(9), S. 622-624.

Taniguchi A, Urano W, Tanaka E, et al. 2007. Validation of the associations between single nucleotide polymorphisms or haplotypes and responses to disease-modifying antirheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis: a proposal for prospective pharmacogenomic study in clinical practice. *Pharmacogenetics and Genomics.* 2007, 17, S. 383-390.

Tappeiner C, Roesel M, Heinz C, et al. 2008. Limited value of cyclosporine A for the treatment of patients with uveitis associated with juvenile idiopathic arthritis. *Eye.* 2008, [Epub ahead of print]. NCBI Entrez PubMed. 13 Jun 2008. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18551142>>.

Tsai YJ, Hoyme HE. 2002. Pharmacogenomics: the future of drug therapy. *Clin Genet.* 2002, 62, S. 257-264.

Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, et al. 2001. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood.* 2001, 98, S. 231-234.

Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, et al. 2002. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of Methotrexate used for the treatment of

rheumatoid arthritis, as evidenced by singlelocus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics*. 2002, 12, S. 183-190.

Van Beynum IM, den Heijer M, Thomas C, et al. 2005. Total homocysteine and its predictors in Dutch children. *Am J Clin Nutr*. 2005, 81, S. 1110-1116.

Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, et al. 1998. A second mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet*. 1998, 62, S. 1044-1051.

Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, et al. 2002. Homocysteine and folate status in methotrexate treated patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2002, 41, S. 658-665.

Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, et al. 2001. The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. A genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum*. 2001, 44(11), S. 2525-2530.

Van Ede AE, Laan RF, Rood MJ, et al. 2001. Effect of folic or folinic acid supplementation on the toxicity and efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis: a forty-eight week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum*. 2001, 44(7), S. 1515-1524.

Van Rossum MA, Fiselier TJ, Franssen MJ, et al. 1998. Sulfasalazine in the treatment of juvenile chronic arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study. Dutch Juvenile Chronic Arthritis Study Group. *Arthritis Rheum*. 1998, 41(5), S. 808-816.

Van Rossum MA, van Soesbergen RM, Boers M, et al. 2007. Long-term outcome of juvenile idiopathic arthritis following a placebo-controlled trial: sustained benefits of early sulfasalazine treatment. *Ann Rheum Dis*. 2007, 66(11), S. 1518-1524.

Varni JW, Seid M, Smith Knight T, et al. 2002. The PedsQL in pediatric rheumatology: reliability, validity, and responsiveness of the Pediatric Quality of Life Inventory Generic Core Scales and Rheumatology Module. *Arthritis Rheum*. 2002, 46, S. 714-725.

Viola S, Felici E, Magni-Manzoni S, et al. 2005. Development and validation of a clinical index for assessment of long-term damage in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2005, 52(7), S. 2092-2102.

Volcik KA, Blanton SH, Northrup H. 2001. Examinations of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutations and in utero viability. (Letter). *Am J Hum Genet*. 2001, 69, S. 1150-1152.

Von Koskull S, Truckenbrodt H, Holle R, Hormann A. 2001. Incidence and prevalence of juvenile arthritis in an urban population of southern Germany: a prospective Study. *Ann Rheum Dis*. 2001, 60, S. 940-945.

Wallace CA, Bleher WA, Sherry DD, et al. 1989. Toxicity and serum levels of methotrexate in children with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1989, 32(9), S. 677-681.

Wallace CA, Huang B, Bandeira M, et al. 2005. Patterns of clinical remission in select categories of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2005, 52, S. 3554-3562.

Wallace CA, Ruperto N, Giannini E. 2004. Preliminary criteria for clinical remission for select categories of juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol*. 2004, 31, S. 2290-2294.

Wegrzyn J, Adeleine P, Miossec P. 2004. Better efficacy of methotrexate given by intramuscular injection than orally in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2004, 63, S. 1232-1234.

Weinshilboum R. 2003. Inheritance and drug response. *NEJM*. 2003, 348(6), S. 529-537.

Weisman MH, Furst DE, Park GS, et al. 2006. Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006, 54, S. 607-612.

- Weller F, Huppertz HI. 2005.** Die Behnadlung des kindlichen Rheumas: Pharmakotherapie. *Z Rheumatol.* 2005, Bd. 64, S. 308-316.
- Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans BT, et al. 2006.** Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis Rheum.* 2006, 54(4), S. 1087-1095.
- Wessels JA, Huizinga TW, Guchelaar HJ. 2008.** Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2008, 47, S. 249-255.
- Whittle SL, Hughes RA. 2004.** Folate supplementation and methotrexate treatment in rheumatoid arthritis: a review. *Rheumatology.* 2004, 43, S. 267-271.
- Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, et al. 2003.** Geographical and ethnic variation of the 677C-T allele of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas worldwide. *J Med Genet.* 2003, 40, S. 619-625.
- Wilson A, Platt R, Wu Q, et al. 1999.** A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab.* 1999, 67, S. 317-323.
- Woo P, Southwood TR, Prieur AM, et al. 2000.** Randomized, placebo-controlled, crossover trial of low-dose oral methotrexate in children with extended oligoarticular or systemic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000, 43, S. 1849-1857.
- Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. 2001.** Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Nat Acad Sci.* 2001, 98, S. 14853-14858.
- Yildirim Y, et al. 2005.** Primary ovarian large B-cell lymphoma in patient with juvenile rheumatoid arthritis treated with low dose methotrexate. *Gynecol Oncol.* 2005, 97(1), S. 249-252.
- Zetterberg H, Regland B, Palmer M, et al. 2002.** Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. *Europ J Hum Genet.* 2002, 10, S. 113-118.
- Zulian F, Martini G, Gobber D, et al. 2004.** Triamcinolone acetonide and hexacetonide intra-articular treatment of symmetrical joints in juvenile idiopathic arthritis: a double-blind trial. *Rheumatology.* 2004, 43, S. 1288-1291.

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ILAR-Klassifikationskriterien (Edmonton 2001) der JIA	7
Tabelle 2: Genpolymorphismen, die die Wirkung von MTX beeinflussen können	18
Tabelle 3: Häufigkeitsverteilung der JIA-Kategorien (n=277)	34
Tabelle 4: Allgemeine Daten zu MTX-Behandlung	35
Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung der MTHFR C677T-Genotypen bzw. des 677T-Allels (Anzahl (%))	36
Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung der MTHFR A1298C-Genotypen bzw. des 1298C-Allels (Anzahl (%))	37
Tabelle 7: Häufigkeitsverteilung der MTHFR A1298C-C677T Genotypkombinationen (Anzahl (%))	37
Tabelle 8: Diagnoseverteilung zwischen einzelnen C677T- bzw. A1298C-Genotypen	37
Tabelle 9: Eigenschaften der Patientensubgruppen mit einzelnen C677T- bzw. A1298C-Genotypen	38
Tabelle 10: Krankheitsaktivität bei MTX-Therapiebeginn unter Patienten mit einzelnen C677T- bzw. A1298C-Genotypen ..	39
Tabelle 11: MTX-Dosierung und Ansprechen auf MTX nach 6 Therapiemonaten	40
Tabelle 12: Anzahl der arthritischen Gelenke bei Therapiebeginn und Ansprechen auf MTX nach 6 Monaten	41
Tabelle 13: Ansprechen auf MTX nach 6 Therapiemonaten (n=211)	41
Tabelle 14: Ansprechen auf MTX nach 6 Monaten unter Patienten mit einzelnen C677T-Genotypen (n=209)	42
Tabelle 15: Ansprechen auf MTX nach 6 Monaten unter Patienten mit einzelnen A1298C-Genotypen (n=210)	42
Tabelle 16: Logistische Regressionsanalyse: Ansprechen auf MTX nach 6 Therapiemonaten	43
Tabelle 17: Ansprechen auf MTX nach 12 Monaten abhängig von MTX-Dosierung	45
Tabelle 18: MTX-Wirksamkeit nach 6 und 12 Therapiemonaten (n=176)	45
Tabelle 19: Ansprechen auf MTX nach 12 Therapiemonaten (n=184)	46
Tabelle 20: Ansprechen auf MTX nach 12 Monaten unter Patienten mit einzelnen C677T-Genotypen (n=182)	46
Tabelle 21: Ansprechen auf MTX nach 12 Monaten unter Patienten mit einzelnen A1298C-Genotypen (n=183)	47
Tabelle 22: Logistische Regressionsanalyse: Ansprechen auf MTX nach 12 Therapiemonaten	47
Tabelle 23: Häufigkeiten der MTX-assozierten Nebenwirkungen (n=277)	48
Tabelle 24: Eigenschaften der Patienten mit und ohne MTX-assozierte Nebenwirkungen (n=277)	49
Tabelle 25: GI-Nebenwirkungen unter MTX und Folatsupplementierung	50
Tabelle 26: Transaminasenerhöhung unter MTX mit und ohne Folatsupplementierung	51
Tabelle 27: Auftreten einer Transaminasenerhöhung mit bzw. ohne Folatsupplementierung	51
Tabelle 28: MTX-assozierte Nebenwirkungen unter einzelnen C677T-Genotypen (n=275)	52
Tabelle 29: MTX-assozierte Nebenwirkungen ohne Folatsupplementierung (n=186)	53
Tabelle 30: MTX-assozierte Nebenwirkungen unter Folatsupplementierung* (n=77)	53
Tabelle 31: MTX-Verträglichkeit mit bzw. ohne Folatsupplementierung unter Patienten mit einzelnen C677T-Genotypen.	53
Tabelle 32: Häufigkeiten der einzelnen Nebenwirkungen bei C677T-Genotypen	54
Tabelle 33: Schwere GI-Symptome unter Patienten mit einzelnen C677T-Genotypen	54
Tabelle 34: GI-Nebenwirkungen mit bzw. ohne Folatsupplementierung unter Patienten mit einzelnen C677T-Genotypen.	55
Tabelle 35: Transaminasenerhöhung unter einzelnen C677T-Genotypen	55
Tabelle 36: Transaminasenerhöhung mit bzw. ohne Folatsupplementierung unter einzelnen C677T-Genotypen	55
Tabelle 37: MTX-induzierte Mukositis unter einzelnen C677T-Genotypen	56
Tabelle 38: Auftreten einer Mukositis unter einzelnen C677T-Genotypen mit bzw. ohne Folatsupplementierung	56
Tabelle 39: MTX-Verträglichkeit bei Patienten mit einzelnen A1298C-Genotypen (n=276)	56
Tabelle 40: MTX-assozierte Nebenwirkungen ohne Folatsupplementierung (n=187)	57
Tabelle 41: MTX-assozierte Nebenwirkungen unter Folatsupplementierung (n=77)	57
Tabelle 42: MTX-Verträglichkeit und Folatsupplementierung unter Patienten mit einzelnen A1298C-Genotypen	58
Tabelle 43: Häufigkeitsverteilung der Nebenwirkungen zwischen einzelnen A1298C-Genotypen	58
Tabelle 44: GI-Nebenwirkungen bei einzelnen A1298C-Genotypen mit und ohne Folatsupplementierung	59
Tabelle 45: GI-Nebenwirkungen und Folatsupplementierung unter Patienten mit einzelnen A1298C-Genotypen	59
Tabelle 46: Schwere GI-Symptome unter Patienten mit einzelnen A1298C-Genotypen	59
Tabelle 47: Transaminasenerhöhung unter einzelnen C677T-Genotypen	60
Tabelle 48: Transaminasenerhöhung mit und ohne Folatsupplementierung unter einzelnen A1298C-Genotypen	60
Tabelle 49: Logistische Regressionsanalyse: MTX-Nebenwirkungen	61

Tabelle 50: Logistische Regressionsanalyse: GI-Nebenwirkungen unter MTX	61
Tabelle 51: Logistische Regressionsanalyse: Transaminasenerhöhung unter MTX.....	62

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Auftrennung der DNA-Fragmente auf dem 3%-Agarosegel mittels Elektrophorese	32
Abb. 2: Häufigkeitsverteilung der JIA-Kategorien (n=277)	34
Abb. 3: Ansprechen auf MTX nach 6 Therapiemonaten	40
Abb. 4: Ansprechen auf MTX nach 12 Therapiemonaten (n=184)	44
Abb. 5: Altersverteilung der Patienten mit bzw. ohne eine 70%ige Verbesserung nach 12 Monaten	44
Abb. 6: Prophylaktische Supplementierung mit Folsäure und MTX-assoziierte Nebenwirkungen	49
Abb. 7: Transaminasenerhöhung unter MTX und Folatsupplementierung	50
Abb. 8: MTHFR C677T-Polymorphismus und MTX-Toxizität	52
Abb. 9: MTHFR A1298C-Polymorphismus und MTX-Toxizität	57

9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACR	<i>Engl.:</i> American College of Rheumatology
AICAR	Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonukleotid-Transformylase
ANA	Antinukleäre Antikörper
ATIC	AICAR-Transformylase
bp	Basenpaar
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	Beziehungsweise
CHAQ	<i>Engl.:</i> Childhood Health Assessment Questionnaire
CHQ	<i>Engl.:</i> Child Health Questionnaire
CI	<i>Engl.:</i> confidence interval (Konfidenzintervall)
CRP	C-reaktives Protein
d.h.	Das heißt
DHF	Dihydrofolsäure
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DMARD	<i>Engl.:</i> disease modifying antirheumatic drug
DNA	<i>Engl.:</i> Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dTMP	Desoxy-Thymidynmonophosphate
dUMP	Desoxy-Uridinmonophosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HLA	<i>Engl.:</i> Human leukocyte antigen
IL	Interleukin
ILAR	<i>Engl.:</i> International League of Associations for Rheumatology
IQR	<i>Engl.:</i> interquartile range (Interquartilabstand)
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis
JRA	Juvenile rheumatoide Arthritis
KG	Körpergewicht
KOF	Körperoberfläche
MS	Methioninsynthetase
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
MTX	Methotrexat
MTXPG	MTX-Polyglutamat
NIH	<i>Engl.:</i> U.S. National Institutes of Health
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OR	<i>Engl.:</i> Odds ratio (Quotenverhältnis)
PCR	<i>Engl.:</i> polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PedsQL	<i>Engl.:</i> Pediatric Quality of Life Inventory
PRINTO	<i>Engl.:</i> Pediatric Rheumatology International Trial Organisation
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
RR	Relatives Risiko
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SD	<i>Engl.:</i> standard deviation (Standardabweichung)
SNP	<i>Engl.:</i> single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotidpolymorphismus)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
THF	Tetrahydrofolsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
TS	Thymidylatsynthetase
u.a.	Unter anderem
v.a.	Vor allem
VAS	Visueller Analogskala
vs.	Versus

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Gayane Poghosyan
Geburtsdatum/-ort	24. Juni 1978 in Jerewan, Armenien
Staatsangehörigkeit	armenisch
Familienstand	ledig

Schulausbildung

1985 - 1995	Marieta-Schahinyan-Sekundarschule in Jerewan, Armenien
22.06.1995	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1995 - 2001	Studium der Humanmedizin, Staatliche Mkhitar-Heratsi-Medizinuniversität in Jerewan, Armenien.
02.07.2001	Ärztliches Staatsexamen und Abschluss des Studiums mit Diplom

Weiterbildung

2001 - 2004	Ärztliche Weiterbildung (Ordinatur) im Gebiet Kinder- und Jugendmedizin, Kinderklinik „Arabkir“ – Institut für Kinder- und Jugendheilkunde, akademisches Lehrkrankenhaus der staatlichen Mkhitar-Heratsi-Medizinuniversität in Jerewan, Armenien.
01.09.2004	Ärztliches Staatsexamen und Abschluss mit Diplom als Facharzt (Ordinator) im Gebiet Kinder- und Jugendmedizin.

Promotion

03.2005 - 07.2005, 09.2006 - dato	Wissenschaftliche Tätigkeit und Anfertigung einer Dissertation im Deutschen Zentrum für Kinder- und Jugendrheumatologie in Garmisch-Partenkirchen, und in der Rheumaeinheit des Klinikums der Ludwig-Maximilians Universität zu München.
04.2007 – 04.2009	Promotionsstudium (Humanmedizin), Ludwig-Maximilians Universität zu München.

Beruflicher Werdegang

11.2001 - 01.2005 und 08.2005 - 03.2006 und 07.2006 - 09.2006	Ärztin in Weiterbildung sowie Assistenzärztin/Kinderärztin, Kinderklinik „Arabkir“ – Institut für Kinder- und Jugendheilkunde, akademisches Lehrkrankenhaus der staatlichen Mkhitar-Heratsi-Medizinuniversität in Jerewan/ Armenien.
04.2006 - 07.2006	Ärztliches Praktikum, Universitätskinderspital Zürich, Abteilung für Kinderrheumatologie
01.2005 - 07.2005	Gastärztin, Deutsches Zentrum für Kinder- und Jugendrheumatologie in Garmisch-Partenkirchen